

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**Estudio comparativo de los dominios  
transportadores de los sistemas de secreción tipo V  
de proteobacterias y su aplicación en la presentación  
de anticuerpos en la superficie de *E. coli***

**Tesis Doctoral**

**Elvira Marín Muñoz**

**Madrid 2009**



Memoria presentada por Elvira Marín Muñoz para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de la Tesis Doctoral:

Luis Ángel Fernández Herrero, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Ángel Fernández Herrero por ser un gran director de tesis y estar siempre preocupado por enseñarte y hacer un buen trabajo.

Grâces Dra. Hilde de Reuse par l'occasion de connaître le Pasteur et apprendre un peu de *Helicobacter pylori*.

A la gran familia del 212. Especialmente a Sofía, Esther, Aitor y Carlos, por los buenos momentos pasados juntos y los ánimos para continuar con el trabajo. Muchas gracias al Dr. Víctor de Lorenzo por sustentar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia.

A las chicas del 214, sobre todo Vicky y Candela, sin vosotras ésto habría sido más difícil.

A mis compañeros, todos los miembros del 241. Nos hemos convertido en una familia y hemos ido creando nuestro laboratorio ideal con cada una de las reformas que hemos ido pasando, es único en el CNB. Especialmente a Ana y Carmen por escucharme y a Gus por su colaboración en el trabajo.

A todas las personas de personal, instrumentación, mantenimiento, almacén, cocinas y un largo etc, que nos facilitan nuestro trabajo. Especialmente Angelines que nos alegra cada mañana.

A la ciencia, gracias a la cual muchas personas han colaborado en mi trabajo al cederme anticuerpos o plásmidos para poder avanzar en mi proyecto.

A mis padres, Miguel y Lola, gracias por la educación que me habéis dado. A mis hermanos, Miguel y Alfonso, sois parte de mí. A mis tías, Marce y Mari, que siempre tratan de ayudar. A Carlos, Mercedes y Javier, por su apoyo incondicional.

A un grupo maravilloso de Bioquímicas, Paloma, Inés, Marga y Ajo, sois las hermanas que no he tenido.

Gracias a todas las personas que de alguna manera me han ayudado a ser un poco mejor cada día, en lo profesional y en lo personal, para poder seguir adelante.



*A mi luz*

*Est sularis oth mithas*

*Il dado è tratto*





# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>17</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
1. La envoltura celular de las bacterias Gram negativas.	23
2. Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas.	25
3. Estructura de las proteínas de membrana externa.	30
4. Plegamiento de las proteínas en el periplasma bacteriano y su inserción en la membrana externa.	32
5. Proteínas del Sistema de Secreción tipo V.	36
6. Modelos de secreción para los Sistemas de Secreción tipo V.	39
7. Exposición de proteínas en la superficie de bacterias Gram negativas y sus aplicaciones biotecnológicas.	42
7.1. Sistemas de exposición: en bacteriófagos ( <i>phage display</i> ) y en bacterias.	43
7.2. Sistemas de exposición asociados a membrana externa y organelas ( <i>bacterial display</i> ).	44
7.3. Anticuerpos recombinantes y su selección.	46
<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
1. Cepas bacterianas.	55
2. Plásmidos.	57
3. Condiciones de cultivo e inducción.	66
4. Electroforesis de proteínas y <i>Western blots</i> .	67
5. Ensayo de accesibilidad a proteasas.	69

6. Análisis de citometría de flujo.	69
7. Inmunoensayos ELISA ( <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> ).	70
8. Ensayo de sensibilidad a antibióticos.	71
9. Entrecruzamiento ( <i>cross-linking</i> ) de proteínas <i>in vivo</i> .	71
10. Purificación de los dominios autotransportadores e Intimina.	72
11. Geles nativos y <i>blue native</i> -PAGE (BN-PAGE).	73
12. Microscopía de inmunofluorescencia.	74
13. Ensayos de agregación bacteriana.	74
14. Fraccionamiento celular y sensibilidad a SDS.	75
15. Transducción con un lisado de P1.	76
16. Caracterización del punto de inserción del minitransposón mTn10::km.	76
17. Análisis mediante MACS ( <i>Magnetic cell sorting</i> ).	76
<b>RESULTADOS</b>	<b>79</b>
<b>1. Caracterización del dominio de autotransporte y su relación estructura-función.</b>	<b>81</b>
1.1. Selección de los autotransportadores y su caracterización <i>in silico</i> .	81
1.2. Plegamiento y capacidad de autotransporte.	85
1.3. Caracterización de la estructura cuaternaria.	89
1.4. Estudio del papel de la hélice $\alpha$ del dominio transportador.	95
<b>2. Papel de las chaperonas periplásmicas y el complejo Bam de membrana externa en el dominio transportador.</b>	<b>104</b>
2.1. Expresión de los dominios transportadores en mutantes nulos en las chaperonas periplásmicas FkpA, Skp, SurA y DegP.	104
2.2. Expresión de los dominios transportadores en un mutante condicional para las chaperonas periplásmicas SurA y DegP.	106
2.3. Expresión de los dominios transportadores en un mutante condicional en <i>bamA</i> .	108
2.4. Expresión de los dominios transportadores en un mutante condicional en <i>bamA</i> y DegP.	110

<b>3. Búsqueda de nuevas proteínas implicadas en el proceso de autotransporte.</b>	<b>112</b>
3.1. Construcción de una genoteca de mutantes de transposición en el genoma de <i>E. coli</i> .	112
3.2. Rastreo de mutantes afectados en el proceso de autotransporte y su caracterización.	113
<b>4. Caracterización del dominio de transporte de Intimina y su relación estructura-función.</b>	<b>116</b>
4.1. Estudio <i>in silico</i> del dominio transportador de Intimina.	116
4.2. Plegamiento del dominio transportador de Intimina.	117
4.3. Estructura cuaternaria.	120
<b>5. Aplicaciones biotecnológicas de los SST5 en la selección de anticuerpos recombinantes presentados en la superficie de <i>E. coli</i> (<i>bacterial display</i>).</b>	<b>123</b>
5.1. Exposición en la superficie bacteriana de <i>Nanobodies</i> fusionados a dominios de autotransporte e Intimina.	123
5.2. Plegamiento y capacidad de unión al antígeno de los <i>Nanobodies</i> presentados en la superficie de <i>E. coli</i> .	126
5.3. Influencia de la formación del puente disulfuro en la actividad de los <i>Nanobodies</i> presentados en la superficie bacteriana.	128
5.4. Aplicación del MACS para la selección de <i>Nanobodies</i> en la superficie de <i>E. coli</i> .	129
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>133</b>
Características comunes del dominio de transporte de los Autotransportadores clásicos.	135
Proteínas celulares implicadas en el plegamiento e inserción en la membrana externa de las proteínas del SST5.	139
Similitudes y diferencias de Intimina con los Autotransportadores clásicos.	142
Evidencias e incertidumbres en el mecanismo de secreción de los SST5	143

<i>Bacterial display</i> de anticuerpos recombinantes empleando los SST5.	147
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>155</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>177</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Envoltura celular de bacterias Gram negativas.	<b>23</b>
<b>Figura 2.</b> Sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas.	<b>25</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura 3D de proteínas de membrana interna y externa de las bacterias Gram negativas.	<b>31</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema de la biogénesis de las proteínas de membrana externa.	<b>36</b>
<b>Figura 5.</b> Organización modular de los autotransportadores clásicos.	<b>36</b>
<b>Figura 6.</b> Estructuras conocidas de los Sistemas de Secreción tipo V.	<b>37</b>
<b>Figura 7.</b> Organización modular de Intimina.	<b>38</b>
<b>Figura 8.</b> Estructura de los dominios pasajeros de Intimina e Invasina.	<b>39</b>
<b>Figura 9.</b> Esquema de los modelos de secreción propuestos para Sistemas de Secreción tipo V.	<b>41</b>
<b>Figura 10.</b> Esquema de los sistemas de exposición en superficie en bacterias Gram negativas.	<b>42</b>
<b>Figura 11.</b> Estructura esquemática de los anticuerpos recombinantes más comunes.	<b>47</b>
<b>Figura 12.</b> Caracterización fenotípica de los mutantes nulos <i>degP</i> , <i>skp</i> y <i>surA</i> en <i>E. coli</i> .	<b>56</b>
<b>Figura 13.</b> Control de desnaturalización de Intimina.	<b>68</b>
<b>Figura 14.</b> Árbol filogenético de las proteobacteria.	<b>81</b>
<b>Figura 15.</b> Predicción de estructura secundaria de los dominios transportadores seleccionados.	<b>84</b>
<b>Figura 16.</b> Predicción de estructura 3D de los dominios transportadores.	<b>84</b>
<b>Figura 17.</b> Estructura modular de las proteínas híbridas de los dominios transportadores.	<b>85</b>
<b>Figura 18.</b> Expresión de las proteínas recombinantes con los dominios transportadores.	<b>87</b>

<b>Figura 19.</b> Exposición en superficie del epítipo-E fusionado a los dominios transportadores.	<b>89</b>
<b>Figura 20.</b> Ensayo de entrecruzamiento de los autotransportadores <i>in vivo</i> .	<b>92</b>
<b>Figura 21.</b> <i>Blue native</i> -PAGE (BN-PAGE) de las proteínas HEA, HES, HEI, HEN y HEBA purificadas de membrana externa de <i>E. coli</i> UT5600.	<b>93</b>
<b>Figura 22.</b> Secuencia de las hélices $\alpha$ predichas de los dominios transportadores.	<b>95</b>
<b>Figura 23.</b> Expresión de las construcciones con y sin la hélice $\alpha$ de los dominios transportadores.	<b>97</b>
<b>Figura 24.</b> Expresión de los intercambios de la hélice $\alpha$ entre los dominios transportadores.	<b>99</b>
<b>Figura 25.</b> Ensayo de agregación de las construcciones <i>wt</i> y los intercambios de la hélice $\alpha$ de los dominios transportadores.	<b>101</b>
<b>Figura 26.</b> Fraccionamiento subcelular de las construcciones JunA, JundA y JunSA.	<b>102</b>
<b>Figura 27.</b> Sensibilidad al SDS de las construcciones JunA, JundA y JunSA.	<b>103</b>
<b>Figura 28.</b> Expresión de los dominios transportadores en mutantes nulos para las principales chaperonas periplásmicas.	<b>105</b>
<b>Figura 29.</b> Análisis de la cepa <i>E. coli</i> UTdegP-P <sub>BAD</sub> :: <i>surA</i> .	<b>107</b>
<b>Figura 30.</b> Expresión de los dominios transportadores en la cepa <i>E. coli</i> UTdegP-P <sub>BAD</sub> :: <i>surA</i> .	<b>108</b>
<b>Figura 31.</b> Análisis de la cepa <i>E. coli</i> UTP <sub>BAD</sub> :: <i>bamA</i> .	<b>109</b>
<b>Figura 32.</b> Expresión de los dominios transportadores en el mutante condicional para BamA.	<b>110</b>
<b>Figura 33.</b> Análisis de la cepa <i>E. coli</i> UTdegP-P <sub>BAD</sub> :: <i>bamA</i> .	<b>110</b>
<b>Figura 34.</b> Expresión de los dominios transportadores en la cepa <i>E. coli</i> UTdegP-P <sub>BAD</sub> :: <i>bamA</i> .	<b>111</b>
<b>Figura 35.</b> Esquema del plásmido pLOF-Km.	<b>113</b>

<b>Figura 36.</b> Rondas de crecimiento e inducción de la genoteca miniTn10::Km transformada con pJun $\beta$ .	<b>114</b>
<b>Figura 37.</b> Ensayo de agregación y ELISA de superficie de clones individuales de tipo 2.	<b>115</b>
<b>Figura 38.</b> Predicción de estructura secundaria de Intimina de EHEC y EPEC.	<b>116</b>
<b>Figura 39.</b> Estructura modular de Intimina completa y esquema de las construcciones.	<b>117</b>
<b>Figura 40.</b> Expresión de las construcciones derivadas de Intimina: Neae, Int550, Int535 e Int522.	<b>119</b>
<b>Figura 41.</b> Análisis del grado de exposición en superficie del epítipo E de las construcciones derivadas de Intimina Int550 y Neae.	<b>120</b>
<b>Figura 42.</b> Determinación de la estructura cuaternaria de Intimina en la membrana externa mediante BN-PAGE.	<b>121</b>
<b>Figura 43.</b> Esquema de las construcciones con un <i>Nanobody</i> fusionado al dominio transportador de un autotransportador o al dominio Neae de Intimina.	<b>124</b>
<b>Figura 44.</b> Expresión de la construcción Neae-VHH en la superficie de <i>E. coli</i> .	<b>124</b>
<b>Figura 45.</b> Expresión de las construcciones con un <i>Nanobody</i> fusionado a los dominios transportadores de los autotransportadores y de Intimina.	<b>125</b>
<b>Figura 46.</b> ELISA de superficie de las construcciones con un VHH fusionado al dominio transportador de los autotransportadores e Intimina.	<b>126</b>
<b>Figura 47.</b> Ensayo de unión mediante ELISA de un VHH fusionado a los dominios transportadores e Intimina.	<b>127</b>
<b>Figura 48.</b> Ensayo de unión al antígeno mediante un ensayo de citometría de flujo.	<b>128</b>
<b>Figura 49.</b> Papel de la DsbA en la unión a su antígeno del VHH fusionado al dominio transportador de EhaA (VHH-A) e Intimina (Neae-VHH).	<b>129</b>
<b>Figura 50.</b> Esquema de un ensayo MACS.	<b>130</b>
<b>Figura 51.</b> Cristal del dominio transportador de EspP.	<b>136</b>
<b>Figura 52.</b> Modelo de secreción para los Sistemas de Secreción tipo V.	<b>145</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.	<b>55</b>
<b>Tabla 2.</b> Listado de plásmidos utilizados en este trabajo.	<b>57</b>
<b>Tabla 3.</b> Construcción de los plásmidos.	<b>61</b>
<b>Tabla 4.</b> Listado de oligos.	<b>63</b>
<b>Tabla 5.</b> Autotransportadores seleccionados.	<b>83</b>
<b>Tabla 6.</b> Ensayo de sensibilidad a antibióticos.	<b>90</b>
<b>Tabla 7.</b> Punto de inserción en el genoma del miniTn10::Km de algunos mutantes Tipo 2.	<b>115</b>
<b>Tabla 8.</b> Selección mediante MACS de <i>Nanobodies</i> expresados en la superficie de <i>E. coli</i> .	<b>131</b>
<b>Tabla 9.</b> Similitud a nivel de secuencia de las chaperonas periplásmicas entre proteobacterias.	<b>140</b>
<b>Tabla 10.</b> Número de prolinas de los dominios transportadores seleccionados.	<b>140</b>
<b>Tabla 11.</b> Similitud a nivel de secuencia de BamA entre proteobacterias.	<b>141</b>



## ABREVIATURAS

<b>2-ME</b>	2-mercaptoetanol
<b>3D</b>	Estructura tridimensional
<b>6H (6xHis)</b>	Secuencia de seis histidinas
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>Ap</b>	Ampicilina
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfato
<b>ATs</b>	Autotransportadores clásicos
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C<sub>H</sub></b>	Dominio constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina
<b>C<sub>L</sub></b>	Dominio constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina
<b>CL</b>	Cremallera de leucina
<b>Cm</b>	Cloramfenicol
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>h</b>	Hora
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactoripanosido
<b>Kb</b>	Kilobase, mil pares de bases
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>ME</b>	Membrana externa
<b>MI</b>	Membrana interna
<b>min</b>	Minutos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PG</b>	Peptidoglicano
<b>POD</b>	Peroxidasa
<b>PK</b>	Proteinasa K
<b>PS</b>	Péptido señal
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>seg</b>	Segundos
<b>Sp</b>	Espectinomicina
<b>spp</b>	Varias especies
<b>Tc</b>	Tetraciclina
<b>V<sub>H</sub></b>	Dominio variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina
<b>V<sub>HH</sub> (VHH)</b>	Dominio variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina de camélido que carece de cadenas ligeras ( <i>heavy chain antibody</i> o <i>camelbody</i> )
<b>V<sub>L</sub></b>	Dominio variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina
<b>wt</b>	<i>Wild type</i> , referido a una cepa o construcción nativa, sin modificar

## SUMMARY

Type V secretion system (T5SS) are the largest group of secreted proteins in Gram-negative bacteria and include adhesins, proteases and cytotoxins of important pathogens. The distinct feature of these secreted proteins is their ability to “self-translocate” across the bacterial cell envelope in the absence of dedicated protein machineries. T5SS include the secreted proteins referred to as autotransporters (AT) and the Intimin/Invasins.

This thesis investigates the secretion mechanism of T5SS through a comparative study of the structural and functional properties of the transport domains from different ATs and Intimin and of their interactions with the bacterial machinery involved in the folding and insertion of outer membrane proteins (OMPs). The predicted transport domain of selected ATs from  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\epsilon$ - and  $\gamma$ -proteobacteria and Intimin were expressed in *E. coli* wild type and mutant strains in the major periplasmic chaperones (SurA, DegP, Skp, FkpA) and the essential BamA (YaeT/Omp85) outer membrane protein (OMP) involved in the biogenesis of OMPs with  $\beta$ -barrel structure. It is shown that ATs from  $\alpha$ -  $\beta$ - and  $\gamma$ -groups are able to fold and transport peptides to *E. coli* surface, whereas AT from  $\epsilon$ -proteobacteria could not be expressed in a functional form. All transport domains from ATs require an N-terminal  $\alpha$ -helix for stability and transport function and form monomers and/or dimers *in vitro* and *in vivo*, except for the IgA protease from *Neisseria gonorrhoeae* that forms a larger oligomer. Intimin transport domain forms a stable dimer. It is also shown that SurA play a role the periplasmic transit and folding of most ATs studied, although the alternative Skp/DegP pathway is used in some cases. Importantly, insertion into the OM of all members of the T5SS is blocked when both periplasmic pathways are inactivated in conditional double mutants. Outer membrane insertion of members of the T5SS is inhibited when BamA is depleted from bacteria, indicating the involvement of the Bam complex in this process. In addition, it is shown the ability of the transport domains of T5SS for the display in the surface of *E. coli* of single-domain antibodies known as Nanobodies in functional form able to bind their cognate antigen. Transport domains showing optimal display levels were use in magnetic cell sorting (MACS) to select bacteria displaying Nanobodies with high affinity and specificity for a given antigen.

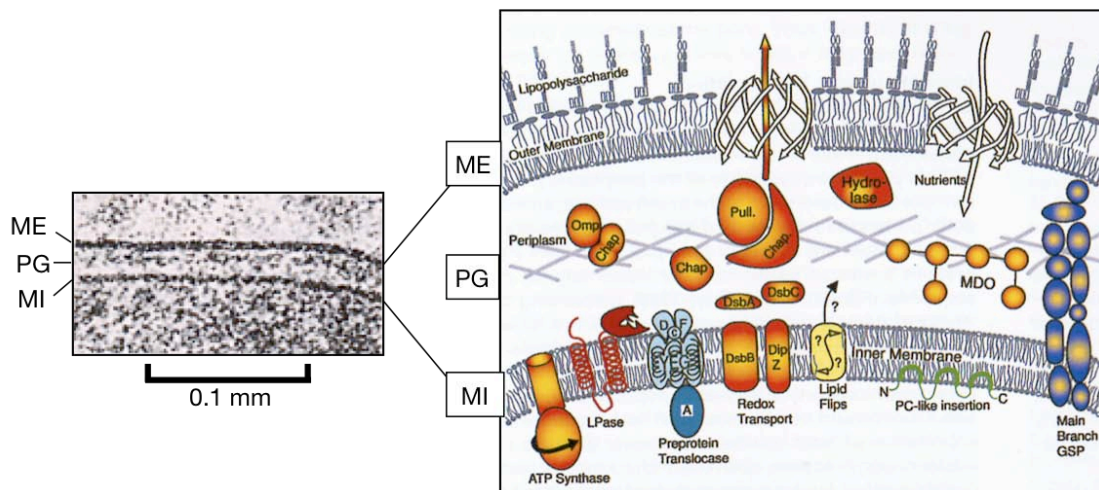


# **INTRODUCCIÓN**



## 1. La envoltura celular de las bacterias Gram negativas.

Las bacterias poseen una envoltura celular que separa el citoplasma del medio extracelular y mantiene la integridad de la célula. Dicha envoltura es necesaria para la correcta compartimentación de las actividades biológicas. En base a la composición de esta envoltura podemos diferenciar dos grandes grupos de bacterias, Gram positivas y Gram negativas. Originalmente esta clasificación se realizaba en función de la tinción de Gram, que debe su nombre a Christian Gram en 1884. Las bacterias Gram positivas tienen una membrana citoplásmica rodeada de una gruesa capa de mureína. Por el contrario, las bacterias Gram negativas poseen una envoltura celular subdividida en tres capas (Figura 1): membrana plasmática, también denominada como membrana interna (MI), periplasma y membrana externa (ME) (Nikaido, 2003; Bos *et al.*, 2007a).



**Figura 1.** Envoltura celular de bacterias Gram negativas.

A la izquierda aparece una imagen de microscopía electrónica de la envoltura de una bacteria Gram negativa (*E. coli*) donde se observa la membrana interna (MI), el peptidoglicano (PG) y la membrana externa (ME). A la derecha se muestra una representación esquemática de la misma, donde se puede apreciar entre otras cosas el lipopolisacárido, y algunas de las proteínas de ME, MI y periplásmicas. Figuras adaptadas de (Lengeler J.W., 1999) y (Duong *et al.*, 1997).

La membrana plasmática es una bicapa lipídica simétrica formada por fosfolípidos, siendo la mayoría fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol. De entre todas las funciones que realiza, controla el transporte de nutrientes al interior celular, la translocación de proteínas e interviene en la síntesis de lípidos y en procesos de fosforilación oxidativa (Luirink *et al.*, 2005;

Ruiz *et al.*, 2006a). Las proteínas integrales de MI se expanden a través de la membrana en forma de hélices  $\alpha$  hidrofóbicas. El periplasma es un espacio acuoso que queda entre las membranas, más denso y rico en proteínas que el citoplasma. Contiene una malla mureína o peptidoglicano (PG) que confiere forma a la célula y ancla diversas lipoproteínas. Además contiene oligosacáridos derivados de la biosíntesis del PG, hidrolasas y otras proteínas solubles que intervienen en diversos sistemas de transporte de pequeñas moléculas, así como proteínas con actividades relacionadas con el plegamiento de otras proteínas. La ME es también una bicapa lipídica, pero en este caso asimétrica. La cara interna tiene una composición en fosfolípidos muy similar a la MI, mientras que la cara externa está compuesta por lipopolisacáridos (LPS). El LPS también denominado endotoxina (del Fresno *et al.*, 2009), son moléculas exclusivas de la ME y están compuestas por una parte hidrofóbica o lípido A (2 glucosaminas unidas por un enlace  $\beta$ -1,6 y aciladas por 6 o 7 ácidos grasos) y una cadena de azúcares complejos que se extienden hacia el exterior (Raetz y Whitfield, 2002; Sperandeo *et al.*, 2009). Los azúcares del lípido A y los próximos a éste presentan numerosos grupos fosfato, lo que confiere carga negativa a la molécula. La ME contiene proteínas con una estructura y composición muy diferente a las proteínas de MI que se discutirá en detalla más adelante.

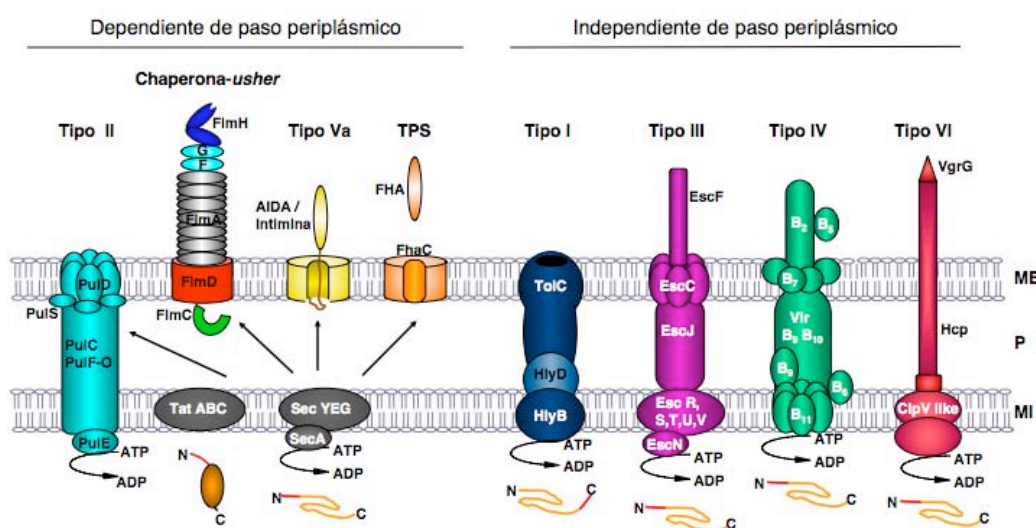
Un grupo muy importante de proteínas son las lipoproteínas, compuestas por una parte proteica y una modificación lipídica en el extremo N-terminal que le confiere propiedades para anclarse a las membranas. Las lipoproteínas se localizan en la cara externa de la MI y la cara interna de la ME (aproximadamente el 90%), es decir, las caras en contacto con el periplasma (Ruiz *et al.*, 2006a). Las lipoproteínas se anclan inicialmente a la MI y mediante el complejo ATPasa LolCDE de MI son expulsadas de ella. Una vez en el periplasma interaccionan con la chaperona LolA y finalmente se insertan en la ME gracias a su interacción con LolB (Okuda y Tokuda, 2009). Se trata de un mecanismo de transporte específico y muy eficiente.



## 2. Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas.

La compartimentación de las células gracias a las membranas lipídicas si bien es necesaria para el correcto desarrollo de las actividades biológicas, supone un problema para el tráfico de información y proteínas a través de éstas. Por ello las bacterias y sobre todo las Gram negativas, pues tienen dos membranas, han resuelto esta situación desarrollando sistemas específicos que les permiten transportar los componentes necesarios para su desarrollo a través de cada una de las membranas, así como su secreción al medio.

En la Figura 2 aparecen esquematizados algunos de los sistemas de secreción de bacterias Gram negativas mejor caracterizados. En algunos de estos sistemas las proteínas se translocan directamente del citoplasma bacteriano al exterior celular mientras que en otros casos el paso a través de la ME viene precedido por un paso intermedio en el periplasma.



**Figura 2.** Sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas.

Se muestra el sistema de la pululanasa en *Klebsiella oxytoca* como modelo de sistema de secreción tipo II (SST2). La biogénesis de fimbrias tipo 1 en *E. coli* como modelo de la ruta chaperona-usher. El sistema de secreción tipo V (SST5) incluye los autotransportadores (ATs) clásicos (tipo Va) como la adhesina AIDA-I de *E. coli*, los ATs triméricos (tipo Vb, no representados), y otras proteínas como las Intiminas de *E. coli* enteropatógenos. Un sistema de secreción cercano al SST5 son los *two partner secretion* (TPS) representados por la secreción de la hemaglutinina filamentosa (FHA) en *Bordetella pertussis*. El sistema de secreción tipo I (SST1) está representado por el sistema de secreción de la  $\alpha$ -hemolisina en cepas de *E. coli* uropatógenas. El sistema de secreción tipo III (SST3) representado por el encontrado en cepas de *E. coli* enteropatógenas. El sistema de secreción tipo IV (SST4) representado por las proteínas Vir de *Agrobacterium tumefaciens*. El sistema de secreción tipo VI (SST6) representado por la secreción de proteínas VrgG de *Vibrio cholerae*. Los polipéptidos secretados se muestran en naranja, los péptidos señal en rojo. Abreviaturas: ME, membrana externa; P, periplasma; MI, membrana interna; N, amino terminal; C, carboxi terminal.

En la mayoría de los casos la secreción a través de la MI está mediada por el sistema general de secreción o translocón Sec (Papanikou *et al.*, 2007). En otros casos, principalmente asociado con la secreción de proteínas plegadas o con cofactores, se emplea el sistema Tat, como por ejemplo en la secreción de la nitrato reductasa (NapA) o la trimetilamina N-óxido reductasa (TorA) en *E. coli* (Bronstein *et al.*, 2004). Su nombre viene de *twin-arginine translocation*, porque en el péptido señal de estas proteínas aparecen dos argininas muy conservadas (Tullman-Ercek *et al.*, 2007; Coulthurst y Palmer, 2008). Una vez en el periplasma encontramos distintos sistemas para llevar a cabo la translocación a través de la ME (Economou *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 2004; Kostakioti *et al.*, 2005).

### **Sistemas de secreción dependientes de paso periplásmico:**

- **Sistemas de secreción tipo II (SST2):** también denominado rama principal (MTB, *main terminal branch*) del sistema de secreción Sec. Es responsable del transporte extracelular de una gran variedad de enzimas hidrolíticas y toxinas desde el periplasma, donde los substratos han adquirido su conformación nativa previamente (Johnson *et al.*, 2006; Coulthurst y Palmer, 2008). Los componentes del SST2 están localizados en la MI y la ME, se ensamblan formando un complejo multiproteico que se expande a través de las membranas o secretón. El complejo requiere de entre 12 y 16 proteínas para llevar a cabo la translocación a través de la ME (Sandkvist, 2001). Algunas de las proteínas secretadas por este sistema son la toxina colérica (tipo AB<sub>5</sub>) de *Vibrio cholerae* (Tsai *et al.*, 2001), la elastasa (LasB) de *Pseudomonas aeruginosa* (McIver *et al.*, 2004) o la pululanasa (PulA) de *Klebsiella oxytoca* (Possot *et al.*, 2000).

Las subunidades de las fimbrias de los pili tipo IV son secretadas por un sistema equivalente al SST2 (Economou *et al.*, 2006). Están implicados en distintos aspectos de la patogénesis como son la adhesión a las células hospedadores, movilidad tipo *twitching* (Pizarro-Cerda y Cossart, 2006) y en la captación de DNA (Proft y Baker, 2009).

- **Sistema de secreción chaperona-usher:** está involucrado en la formación de fimbrias (pili) y otras estructuras fibrilares adhesivas, siendo las más representativas las fimbrias tipo 1 de cepas de *E. coli* uropatógenicas (Sauer *et al.*, 2004; Nishiyama *et al.*, 2008). Es necesario que las distintas subunidades fimbriales sean translocadas por el sistema Sec a través de la MI para que una vez en el periplasma comience el ensamblaje empleando la ruta chaperona-usher. Una chaperona fimbrial periplásmica (FimC) se une a las proteínas que van a ser secretadas y las presenta a una proteína de ME, denominada usher (FimD, acomodador) con un poro central por el que van a atravesar la ME las distintas subunidades (Remaut *et al.*, 2008).

- **Sistemas de secreción tipo V (SST5):** también denominado autotransportadores (ATs). Su nombre se debe a que la proteína secretada contiene toda la información necesaria para su translocación a través de las membranas sin una maquinaria accesoria especializada. Los ATs se dividen en dos grandes grupos, los ATs clásicos o tipo Va y los ATs triméricos o tipo Vb que se asemejan en su estructura secundaria y en el mecanismo de secreción (Henderson *et al.*, 2004) (ver Figura 6).

**Intiminas e Invasinas** también poseen capacidad de autotransporte, lo que sugiere que podrían utilizar un mecanismo análogo al de los ATs para su secreción y podrían englobarse dentro de los SST5. Su secuencia polipeptídica contiene toda la información necesaria para su translocación a través de las membranas, al igual que los ATs. La mayor diferencia radica en la organización estructural de sus dominios, que es opuesta entre los ATs clásicos e Intiminas/Invasinas. Además, las estructuras conocidas de los dominios secretados por los ATs clásicos (pasajeros nativos) (Otto *et al.*, 2005; Emsley *et al.*, 1996; Gangwer *et al.*, 2007) y triméricos (Nummelin *et al.*, 2004) son grandes hélices  $\beta$  paralelas mientras que los dominios secretados de Intiminas e Invasinas son pequeños dominios globulares en tándem tipo inmunoglobulina (comparar Figuras 6 y 8).

El estudio de estos sistemas, ATs e Intimina, constituye el núcleo del presente trabajo, con lo que profundizaremos en su descripción en el Apartado 5 de la Introducción.

- **Sistema de secreción TPS (*two partner secretion*):** están formados por dos proteínas, una proteína secretada (TpsA) y un transportador específico (TpsB) (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Ambas proteínas son translocadas a través de la MI por el sistema Sec. TpsB se inserta en la ME permitiendo el paso de TpsA a través de ésta gracias al reconocimiento de un dominio específico en el extremo N de TpsA (denominado dominio TPS). Uno de los modelos más estudiados es la hemaglutinina filamentosa FHA de *Bordetella pertussis*, donde TpsB es FhaC y TpsA es FHA (Clantin *et al.*, 2007; Clantin *et al.*, 2004). Es un sistema cercano a los ATs clásicos debido a la similitud estructural entre TpsA y el dominio pasajero de los ATs (Clantin *et al.*, 2004; Hodak y Jacob-Dubuisson, 2007). A su vez, TpsB pertenece a la misma superfamilia de proteínas de ME que BamA, componente del complejo Bam ( *$\beta$ -barrel assembly machinery*) (Voulhoux *et al.*, 2003; Clantin *et al.*, 2007; Knowles *et al.*, 2009) (Ver Figura 3D).

### **Sistemas de secreción independientes de paso periplásmico:**

- **Sistemas de secreción tipo I (SST1):** las proteínas secretadas por estos sistemas carecen de un péptido señal en el extremo N-terminal, tienen una señal de secreción en el extremo C-terminal, y no son procesadas durante su secreción pues pasan directamente desde el citoplasma al medio extracelular a través de un canal multiproteico que conecta la MI y la ME. El prototipo es el sistema de secreción de la  $\alpha$ -hemolisina (HlyA) de cepas de *E. coli* uropatógenas (Gentschev *et al.*, 2002). Las proteínas secretadas son generalmente toxinas de alto peso molecular o exoenzimas. Los SST1 están compuestos por tres proteínas: una proteína de ME que forma un poro hidrofílico hacia el periplasma, una proteína que conecta las dos membranas (MFP, *membrane fusion protein*) y un transportador ABC (*ATP binding cassette*). Estas proteínas en el sistema de secreción de HlyA en *E. coli* son TolC, HlyD y HlyB respectivamente (Henderson *et al.*, 2004) (Ver Figura 3E). Otros ejemplos son la adenilato ciclasa (CyaA) de

*Bordetella pertussis* (Cheung *et al.*, 2009) o la leucotoxina (LktA) de *Pasteurella haemolítica* (Highlander *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1995).

- **Sistemas de secreción tipo III (SST3):** la secreción de las proteínas ocurre directamente desde el citoplasma de la bacteria al citoplasma de la célula eucariota, por ello se denomina a dicha secreción inyección. Estos sistemas tienen un papel central en la patogénesis de las bacterias Gram negativas. El primer SST3 identificado fue la secreción de las proteínas Yop en *Yersinia* spp (Michiels *et al.*, 1990), después se han encontrado en una gran variedad de patógenos humanos, de animales y plantas, en cepas de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* (Galan y Wolf-Watz, 2006; Mueller *et al.*, 2008). Son sistemas muy complejos en los que más de 20 polipéptidos forman la maquinaria secretora, que se conserva entre los diferentes patógenos, sin embargo, las proteínas secretadas o efectoras difieren mucho entre ellas (Plano *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2008). Los componentes comunes de los SST3 son una estructura homóloga al cuerpo basal del flagelo. Se trata de un componente multimérico que forma un poro en la ME y un apéndice extracelular que contacta con la célula eucariota.

- **Sistemas de secreción tipo IV (SST4):** están relacionados con las maquinarias de conjugación bacteriana y, al igual que los SST3, son capaces de translocar proteínas intercelularmente. Estos sistemas dirigen la secreción o transferencia de proteínas y complejos proteína-DNA. Aunque frecuentemente son sistemas de secreción independientes de un paso en el periplasma, depende de cada caso concreto. Las subunidades de la toxina pertussis del género *Bordetella* pasan vía Sec al periplasma donde se ensambla la holotoxina antes de ser secretada a través de la ME (Shrivastava y Miller, 2009). Por el contrario, en el transporte de DNA oncogénico por *A. tumefaciens* (Christie y Cascales, 2005) o el transporte de la toxina CagA de *H. pylori* (Backert y Selbach, 2008), las subunidades se transfieren en un sólo paso desde el citoplasma hasta la célula eucariota.

- **Sistemas de secreción tipo VI (SST6):** se descubrieron en el 2006 y son poco conocidos (Pukatzki *et al.*, 2006). Es necesario para la secreción de factores de virulencia al medio extracelular y dicha secreción es dependiente de ATP. Los componentes del SST6 están codificados en un único *cluster* que contiene ~15 ORFs (*open reading frames*). Está descrito en *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2007) y en *Pseudomonas aeruginosa* (Mougous *et al.*, 2006). Los substratos son sintetizados sin un péptido señal amino-terminal tipo-Sec, lo que sugiere que es un sistema independiente del sistema Sec y del sistema Tat. Trabajos recientes demuestran una relación estructural entre el SST6 y las proteínas de la cola de los bacteriófagos T4 y  $\lambda$  (Leiman *et al.*, 2009; Pell *et al.*, 2009).

### 3. Estructura de las proteínas de membrana externa.

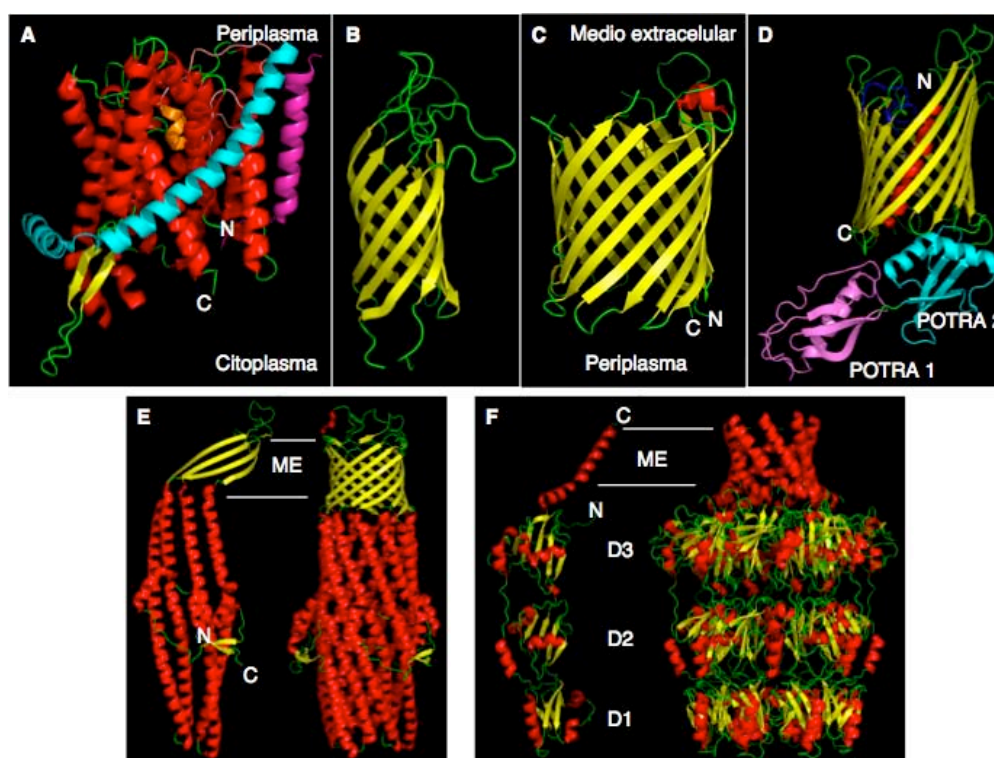
La estructura de las proteínas de membrana está determinada por el hecho de que muchos de sus aminoácidos (aa) deben interaccionar con los lípidos, un ambiente hidrofóbico. Al igual que la composición en lípidos varía entre la membrana externa e interna en las bacterias Gram negativas, la estructura de las proteínas es distinta en ambas membranas. El número de estructuras conocidas de proteínas de membrana (tanto bacterianas como de eucariotas) ha aumentado significativamente en los últimos años. En 2006 se conocían 218 estructuras y en 2008 unas 428 ([http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane\\_Proteins\\_xtal.html](http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html)).

**Proteínas con estructura en hélice  $\alpha$ :** la estructura de las **proteínas de MI** está compuesta por hélices  $\alpha$  hidrofóbicas que atraviesan la bicapa lipídica. Una de las proteínas de MI más importante es SecY, es el transportador del sistema Sec (Mitra *et al.*, 2005). SecY forma parte de una estructura oligomérica, formada por la dimerización del heterotrímero SecYEG. También denominado PCC (*protein-conducting channel*) (Figura 3A).

En la ME las proteínas no presentan, salvo excepciones, hélices  $\alpha$  que atraviesen la bicapa lipídica. El transportador **Wza** es, hasta la fecha, la única proteína de ME con una conformación de hélices  $\alpha$  transmembrana. Wza es un oligómero



formado por ocho subunidades y las hélices  $\alpha$  anfipáticas de cada subunidad se asocian formando un barril  $\alpha$  que atraviesa la ME (Ver Figura 3F) (Dong *et al.*, 2006). Wza es una lipoproteína implicada en el transporte de los polisacáridos de la cápsula del grupo 1. La secretina (PilQ) que media la transición de los pili tipo IV a través de la ME tiene similitudes estructurales con Wza (Collins y Derrick, 2007).



**Figura 3.** Estructura 3D de proteínas de membrana interna y externa de las bacterias Gram negativas.

**A.** El heterotrímero SecYEG de *E. coli*, donde SecY es la estructura principal en rojo, Sec E en azul y SecG en rosa (Mitra *et al.*, 2005). En naranja, en el centro de SecY, aparece un pequeño cierre o *plug* del canal de SecY. **B.** OmpA de *E. coli*, barril  $\beta$  compuesto por 8 hojas  $\beta$  (Pautsch y Schulz, 2000). **C.** OmpG de *E. coli*, única porina monomérica de 14 hojas  $\beta$  (Subbarao y van den Berg, 2006). **D.** FhaC de *Bordetella pertussis*, en azul oscuro se muestra el bucle-6 que bloquea el paso de proteínas a través del poro. El barril está formado por 16 hojas  $\beta$ . Los dominios POTRA aparecen en la parte inferior en rosa y azul celeste (Clantin *et al.*, 2007). **E.** Trímero de TolC de *E. coli* formando un barril de 12 hojas  $\beta$  (Koronakis *et al.*, 2000). A la izquierda aparece la estructura de un monómero, que aporta 4 hojas  $\beta$  al barril. **F.** Octámero de Wza de *E. coli* (Dong *et al.*, 2006). A la izquierda aparece la estructura de un monómero. En amarillo las hojas  $\beta$ , en rojo las hélices  $\alpha$  y en verde los bucles. La orientación es la misma para todas las estructuras, en la parte inferior el periplasma y en la superior el medio extracelular, excepto para SecYEG que se indica su orientación. Abreviaturas: N y C son los extremos amino- y carboxi-terminales respectivamente.

**Proteínas con estructura en hoja  $\beta$ :** exceptuando Wza, todas las proteínas de ME bacterianas tienen una estructura característica de barril  $\beta$ . Dicha estructura está formada por un número par de hojas  $\beta$  anfipáticas que se organizan de una

forma antiparalela para dar lugar a un barril  $\beta$ . Sólo se conoce una estructura con número impar de hojas  $\beta$ , que corresponde a la proteína VDAC de la ME de mitocondrias de células eucariotas. Está formado por 19 hojas  $\beta$ , que mantienen la organización antiparalela salvo entre la primera y la última (Hiller *et al.*, 2008).

Los barriles  $\beta$  se insertan en la ME y pueden generar un poro hidrofílico en su interior por el que permitir el paso de moléculas de bajo peso molecular (Ej. porinas como OmpG, Figura 3C) o proteínas TPS (Figura 3D). Los bucles que conectan las hojas  $\beta$  no tienen una estructura secundaria determinada y suelen ser más largos los que se encuentran en el medio extracelular que los que están en el periplasma.

Se pueden apreciar las diferencias entre las estructuras 3D de las proteínas de MI y las proteínas de ME, las primeras basadas en hélices  $\alpha$  y las segundas en hojas  $\beta$  para componer la región transmembrana de la proteína (Figura 3). Es de destacar que en todas las proteínas de ME el poro hidrofílico del barril  $\beta$  es muy estrecho. En el caso de los TPS (Figura 3D) y de los ATs (ver Figura 6) dicho poro está ocupado por una hélice  $\alpha$  y el diámetro interno es de 1-2 nm. Los dominios POTRA (*polypeptide-transport associated domain*) (Figura 3D) son necesarios para el reconocimiento del dominio TPS, que permite que se desplace el bucle-6 (en azul oscuro) y se transloque la proteína (TpsA) a través del poro. Dichos dominios son también esenciales para BamA en el reconocimiento de las proteínas de ME para la inserción de éstas en la ME (Voulhoux *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007).

#### **4. Plegamiento de las proteínas en el periplasma bacteriano y su inserción en la membrana externa.**

El plegamiento de las proteínas de ME requiere de distintas actividades de chaperona presentes en el periplasma. Dichas chaperonas se encargan del plegamiento y/o mantenimiento de las proteínas de ME en un estado competente para su translocación a través de la ME. Las actividades chaperonas se dividen en tres grandes grupos: factores que catalizan la formación e



isomerización de los puentes disulfuro (p. Ej. DsbA, DsbC), peptidil-prolil *cis/trans* isomerasas (PPlasas) (p. Ej. FkpA, PpiA, PpiD) y chaperonas generales (SurA, Skp y DegP) (Sklar *et al.*, 2007b). Aparte de su función como chaperonas generales, SurA y DegP tienen una actividad dual, PPlasa y proteasa respectivamente (Behrens *et al.*, 2001; Spiess *et al.*, 1999). Además, recientemente se ha descubierto que las proteínas de ME necesitan para su inserción en la ME de un complejo multiproteico de ME conocido como complejo Bam (Gentle *et al.*, 2004; Malinverni *et al.*, 2006; Bos *et al.*, 2007b; Voulhoux y Tommassen, 2004; Wu *et al.*, 2005).

**Formación e isomerización de puentes disulfuro:** un puente disulfuro o enlace cistina es un enlace covalente entre dos grupos tiol provenientes de dos cisteínas, cuya formación confiere estabilidad y fija la estructura terciaria de las proteínas. *In vivo* la formación de dicho enlace requiere de actividades enzimáticas específicas, que en las bacterias Gram negativas se localizan en el periplasma. DsbA es la proteína principal encargada de la formación de puentes disulfuro. Es una proteína periplásmica de pequeño tamaño de la superfamilia de las tiorredoxinas (Eppens *et al.*, 1997). DsbB mantiene a DsbA en estado oxidado. La maquinaria de oxidación de los puentes disulfuro en otros organismos es muy variable con respecto a *E. coli* K-12 (Heras *et al.*, 2009). El proceso de isomerización de los puentes disulfuro en *E. coli* K-12 es llevado a cabo por las proteínas periplásmicas DsbC y DsbG, que se mantienen en estado reducido gracias a la proteína de MI DsbD (Ito y Inaba, 2008; Heras *et al.*, 2009).

**Actividad peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa (PPlasa):** una de las PPlasa mejor caracterizadas es FkpA (Saul *et al.*, 2004). Es una proteína con actividad PPlasa y también chaperona, cuya expresión se activa por choque térmico aunque no es esencial para la viabilidad de *E. coli*. Está implicada en el plegamiento de las proteínas periplásmicas solubles y está descrito que aumenta la actividad de distintos anticuerpos recombinantes expresados en el periplasma de *E. coli* (Justice *et al.*, 2005; Arie *et al.*, 2001).

### Chaperonas generales:

**SurA** es una chaperona muy importante, ya que en un mutante nulo *surA* se produce una disminución de la densidad de la ME y varias proteínas integrales de ME reducen sus niveles (p. Ej. OmpA, OmpC, OmpF, LamB) (Sklar et al., 2007b), presentando también una hipersensibilidad a detergentes (SDS) y antibióticos hidrofóbicos (bacitracina, vancomicina y sales biliares) (Lazar y Kolter, 1996; Rouvière y Gross, 1996). La pérdida de SurA provoca una inducción de estrés extracitoplásmico dependiente de  $\sigma^E$  (Behrens et al., 2001; Alba y Gross, 2004; Rhodius et al., 2006), que provoca un aumento de los niveles de Skp/DegP (Dartigalongue et al., 2001) y la inducción de sRNAs que inhiben la síntesis de algunas proteínas de ME (Vogel y Papenfort, 2006; Udekwi y Wagner, 2007). Se ha demostrado que *in vivo* SurA interacciona directamente con BamA en *E. coli* (Sklar et al., 2007b) y además los defectos en la biosíntesis de las proteínas de ME en el mutante nulo *surA* son indistinguibles del mutante *bamB*, lo que indica que desarrollan una actividad similar en la ruta (Ureta et al., 2007).

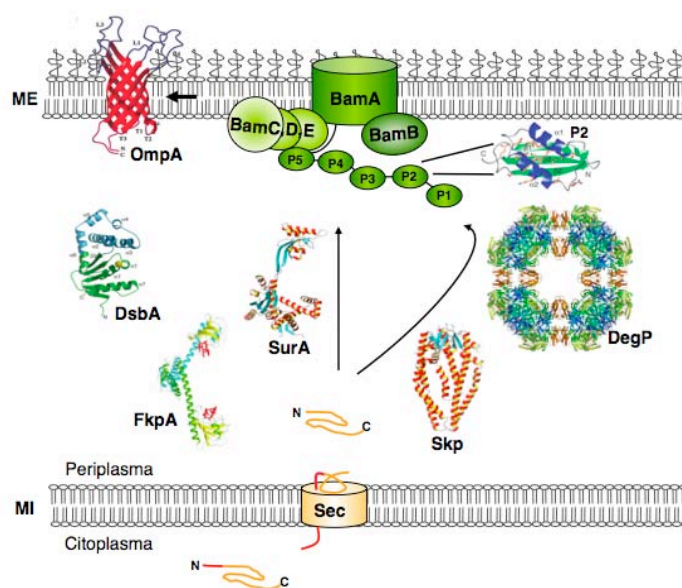
**Skp/DegP** forman parte de una ruta alternativa a la ruta de SurA (Sklar et al., 2007b). La mutación de ellas conlleva defectos débiles en la composición de la ME. Sin embargo, su mutación combinada a la mutación *surA* es letal en *E. coli* (Rizzitello et al., 2001). **Skp** es una chaperona soluble, que forma un homotrímero (Schlapschy et al., 2004). Aparece asociada a la cara periplásmica de la MI para interactuar con las proteínas de ME nacientes (Harms et al., 2001). **DegP** tiene un papel muy importante en el control del plegamiento de las proteínas de ME, determinando si éstas continúan con su plegamiento o son degradadas y lo que afecta a la estructura oligomérica de DegP (Krojer et al., 2008).

En base a un fenotipo de letalidad sintética en un doble mutante *surA degP* o *surA skp* se sugiere que SurA y Skp/DegP forman parte de dos rutas paralelas de plegamiento de las proteínas de ME, para que así al menos una de las rutas sea funcional y mantenga la viabilidad de la célula (Rizzitello et al., 2001; Sklar et

al., 2007b). Por el contrario, el doble mutante *skp degP* sólo es letal a 37 °C o temperaturas superiores en algunas cepas de *E. coli* (Schäfer *et al.*, 1999).

**Complejo Bam:** en *E. coli* está formado por una proteína de ME denominada BamA que es esencial (previamente YaeT en *E. coli* y Omp85 en *Neisseria spp*) y cuatro lipoproteínas (BamB-E, denominadas previamente YfgL, NlpB, YfiO y SmpA) (Misra, 2007; Wu *et al.*, 2005). Los genes que codifican estos elementos están situados en puntos diferentes del genoma. Además de BamA, también es esencial la lipoproteína BamD (YfiO) que forma parte de un subcomplejo BamCDE que interacciona directamente con SurA (Sklar *et al.*, 2007a). Es necesario un complejo Bam funcional para la biogénesis de las proteínas de ME tales como OmpA, LamB, PhoE y TolC. Todas ellas son barriles  $\beta$  que se insertan en la ME (Doerrler y Raetz, 2005; Werner y Misra, 2005; Robert *et al.*, 2006).

El complejo Bam recluta las proteínas de ME desde el periplasma, asociadas a chaperonas y las ensambla e inserta en la ME de un modo todavía por determinar (Ruiz *et al.*, 2006b; Bos *et al.*, 2007a; Knowles *et al.*, 2009). En ausencia de BamA, las proteínas de ME se acumulan en el periplasma en conformación desplegada y son degradadas por DegP. BamA es una proteína ampliamente conservada en la evolución de las bacterias Gram negativas, así como en la mitocondria y los cloroplastos (Voulhoux y Tommassen, 2004; Surana *et al.*, 2004; Gentle *et al.*, 2004). Sin embargo las lipoproteínas que la acompañan en *E. coli* no están conservadas (Gatsos *et al.*, 2008). La combinación de un mutante BamC-SurA produce un fenotipo de letalidad sintética, por ello se propone que BamC y Skp-DegP forman parte de la misma ruta de plegamiento (Knowles *et al.*, 2009). También es letal la combinación de un mutante BamB con un mutante en una chaperona periplásmica (SurA, DegP o FkpA) (Knowles *et al.*, 2009).

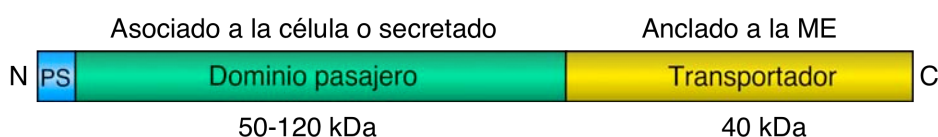


**Figura 4.** Esquema de la biogénesis de las proteínas de membrana externa.

En la figura aparecen las estructuras 3D de las chaperonas periplásmicas: DsbA (Inaba, 2008), FkpA (Saul et al., 2004), SurA (Bitto y McKay, 2002), Skp (Walton y Sousa, 2004) y DegP (Krojer et al., 2008). El complejo Bam de membrana externa en *E. coli* está compuesto por la proteína de ME BamA y cuatro lipoproteínas BamB-E. Se presenta la estructura cristalina del dominio POTRA 2 (P2) (Misra, 2007). Como proteína de ME modelo mostramos el cristal del dominio de membrana de OmpA (Pautsch y Schulz, 2000). Los polipéptidos secretados se muestran en naranja, los péptidos señal en rojo. Abreviaturas: ME, membrana externa; MI, membrana interna; N, amino terminal; C, carboxi terminal.

## 5. Proteínas del Sistema de Secreción tipo V.

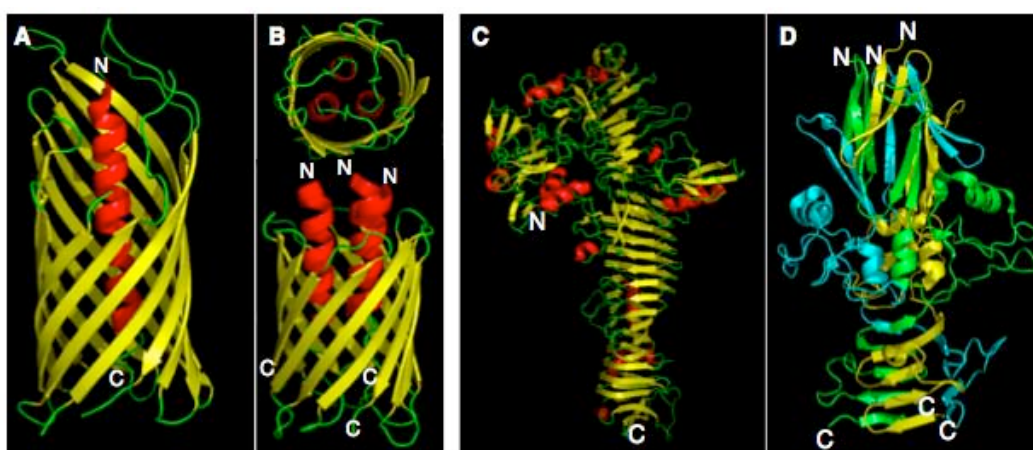
Los también denominados **ATs** son la mayor familia de proteínas secretadas en bacterias Gram negativas y están ampliamente distribuidos en todos los géneros de proteobacterias (Yen et al., 2008; Henderson et al., 2004). Están presentes en 358 especies diferentes y se han encontrado 1780 secuencias que corresponden a ATs (Pfam familia PF03797). La estructura modular de todos los ATs clásicos es idéntica. Presentan largos péptidos señales (PS) en el extremo N-terminal que permiten la translocación a través de la MI vía Sec y el dominio C-terminal transloca el resto de la proteína (pasajero) a través de la ME (Figura 5) (Peterson et al., 2006). Dicho dominio es de gran tamaño (50-120 kDa) en comparación con el dominio transportador (~40 kDa).



**Figura 5.** Organización modular de los autotransportadores clásicos.

Se indican los extremos N y C terminales, así como el péptido señal (PS), el dominio pasajero y transportador.

El dominio pasajero contiene una actividad biológica variable (proteasa, adhesina, citotoxina, factor de resistencia al complemento, factor de polimerización de actina) y desempeña un papel muy importante en la patogénesis. Algunos ejemplos son las IgA proteasas de *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae* (Kilian *et al.*, 1980; Mistry y Stockley, 2006); citotoxinas como VacA de *H. pylori* (Marshall y Warren, 1984; Wen y Moss, 2008); adhesinas como AIDA-I y Ag43 de *E. coli* (Konieczny *et al.*, 2001; Klemm *et al.*, 2004) o ShdA de *S. enterica* (Kingsley *et al.*, 2004). Después de su translocación, el dominio pasajero normalmente (pero no siempre) es degradado proteolíticamente mediante diferentes mecanismos y liberado al medio extracelular (St Geme y Cutter, 2000; Charbonneau *et al.*, 2009).



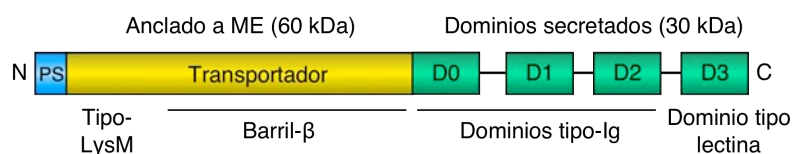
**Figura 6.** Estructuras conocidas de los Sistemas de Secreción tipo V.

**A** y **C** corresponden a ATs clásicos; **B** y **D** a ATs triméricos. **A.** Cristal del dominio transportador de NalP de *N. meningitidis*, el barril está formado por 12 hojas  $\beta$  (Oomen *et al.*, 2004). **B.** Cristal del dominio transportador de Hia de *Haemophilus influenzae* (Meng *et al.*, 2006). Es un homotrímero, cada subunidad aporta 4 hojas  $\beta$  y una hélice  $\alpha$ . En la parte superior se muestra la vista cenital. **C.** Cristal del dominio pasajero de Hbp de *E. coli* (Otto *et al.*, 2005). **D.** Cristal del dominio pasajero de Hia de *Haemophilus influenzae* (Meng *et al.*, 2008). Cada monómero aparece en un color. Código de colores para A, B y C: hojas  $\beta$  (amarillo), hélice  $\alpha$  (rojo), bucles (verde).

La estructura de todos los dominios pasajeros conocidos, tanto de los ATs clásicos (Otto *et al.*, 2005; Emsley *et al.*, 1996; Gangwer *et al.*, 2007) (Figura 6C), como de los ATs triméricos (Meng *et al.*, 2008; Nummelin *et al.*, 2004) (Figura 6D), así como de las proteínas TpsA (Clantin *et al.*, 2004) es una hélice  $\beta$  de hojas  $\beta$  paralelas, tres por cada vuelta de hélice. La única estructura completa

caracterizada de un dominio pasajero pertenece al AT Hbp de *E. coli* (Figura 6C) (Otto et al., 2005).

**Intiminas e Invasinas** presentan ligeras similitudes con los ATs, pero con una organización estructural opuesta a éstos. Intimina posee un PS largo (1-39 aa) que dirige la secreción de la proteína a través de la MI vía Sec; a continuación un dominio tipo-LysM (64-113 aa) que ancla la proteína al PG (Bateman y Bycroft, 2000; Buist et al., 2008). Le sigue el dominio transportador (160-550 aa) necesario para la translocación a través de la ME del dominio secretado (551-939 aa) situado en el extremo C-terminal (Figura 7). El dominio transportador se pliega dando lugar a un barril  $\beta$  en base a datos de dicróismo circular (Touze et al., 2004).



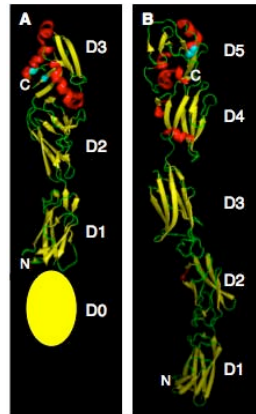
**Figura 7.** Organización modular de Intimina.

Se indican los extremos N y C terminales, así como el péptido señal (PS), el dominio transportador y los dominios pasajeros.

El dominio secretado de las Intiminas está compuesto por tres dominios tipo inmunoglobulina (Ig) y un dominio tipo lectina que contiene un puente disulfuro, en el extremo C-terminal (Figura 8A). Intimina es la adhesina que permite la unión íntima al enterocito en las infecciones de *E. coli* patógenos (Newman y Stathopoulos, 2004; Luo et al., 2000; Touze et al., 2004). La unión de EPEC (enteropatógeno) y EHEC (enterohemorrágico) al enterocito induce la destrucción del *microvilli*; ésta lesión se denomina de “unión y barrido”. Intimina media la unión al enterocito por su interacción con la proteína Tir (*translocated intimin receptor*), que es translocada de la bacteria a la célula eucariota por el SST3 (Garmendia et al., 2005). Las Invasinas presentan una estructura modular análoga a la de las Intiminas, con varios dominios tipo-Ig (D1-D4) y un dominio tipo lectina que se une a las integrinas de las células eucariotas (D5) (Figura 8B). Dicha unión conlleva la invaginación de la membrana plasmática de la célula



eucariota y la endocitosis de la bacteria. La presencia en la superficie de bacterias no invasivas o sobre bolitas de látex de los últimos 497 aa de Invasina de *Y. pseudotuberculosis* es suficiente para que se induzca el proceso de invaginación (Leong *et al.*, 1995).



**Figura 8.** Estructura de los dominios pasajeros de Intimina e Invasina.

**A.** Cristal del dominio pasajero de Intimina, dominios D1-D2-D3 (Int280). La estructura 3D del dominio D0 de Intimina se puede predecir en base al dominio D1 de Invasina (Luo *et al.*, 2000). **B.** Cristal del dominio pasajero de Invasina de *Y. pseudotuberculosis* (Hamburger *et al.*, 1999). Código de colores: hojas  $\beta$  (amarillo), hélices  $\alpha$  (rojo), bucles (verde). Se marca en azul los aminoácidos implicados en la formación del puente disulfuro en Intimina (dominio D3) y en Invasina (dominio D5).

## 6. Modelos de secreción para los Sistemas de Secreción tipo V.

Desde su descubrimiento (Pohlner *et al.*, 1987) ha existido una gran controversia sobre el mecanismo por el cual los ATs se insertan en la ME y llevan a cabo la translocación del dominio pasajero a través de la misma, ya que este proceso ocurre en el periplasma en ausencia de fuentes de energía como el ATP o la fuerza protón-motriz y sin la aparente necesidad de otras proteínas accesorias. Los ATs presentan muy poca similitud a nivel de secuencia, tamaño o función; en cambio a nivel de estructura secundaria y terciaria son muy similares. Siempre se predice un barril  $\beta$  en el dominio transportador y una hélice  $\beta$  en >97% de los casos en el dominio pasajero (Junker *et al.*, 2006), por ello se postula que el mecanismo de secreción debe de ser común entre todos los ATs.

Se han propuesto tres modelos que se detallan a continuación (Figura 9).

**Modelo de secreción en horquilla:** el dominio pasajero es secretado de un modo vectorial a través del poro del barril  $\beta$  que forma el dominio transportador

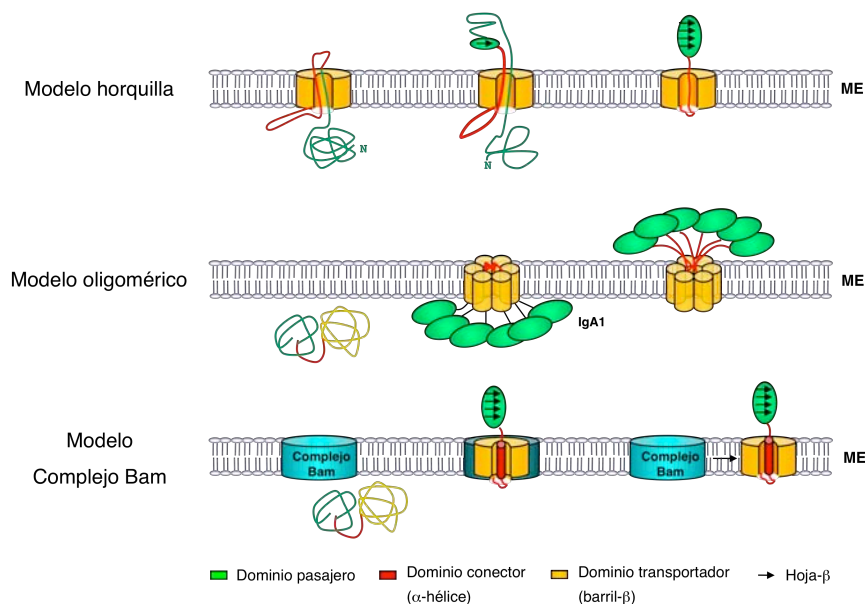
en la ME. La translocación la inicia el extremo C-terminal del dominio pasajero. Una vez se forma una horquilla en la superficie de la célula se crea un punto de nucleación del plegamiento (indicado en la Figura 9 como un círculo verde) que permite el plegamiento del resto del dominio pasajero (Oliver *et al.*, 2003). Dicho punto de nucleación del plegamiento o dominio “auto-chaperona” se ha descrito en algunos casos y predice para otros ATs pero no está claro que aparezca en todos (Mogensen *et al.*, 2005; Renn y Clark, 2008). Se propone que el plegamiento del dominio pasajero en la superficie de la célula aporta la energía necesaria para el proceso de translocación a través de la ME. Este modelo es un refinamiento del modelo propuesto originalmente por el grupo del Dr. Thomas Meyer (Pohlner *et al.*, 1987; Loveless y Saier, 1997). Trabajos muy recientes apoyan una secreción vectorial iniciada por el extremo C-terminal del dominio pasajero (Junker *et al.*, 2009). Este modelo es incompatible con los datos que apuntan a que los dominios pasajeros pueden alcanzar un alto nivel de estructura terciaria en el periplasma antes de su secreción (Veiga *et al.*, 2004; Skillman *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2009).

**Modelo de oligomerización:** propone que los dominios transportadores son capaces de interactuar entre sí en la ME formando un oligómero con un canal hidrofílico central y la translocación de los dominios pasajeros ocurre a través de este poro y no a través del poro de cada uno de los barriles  $\beta$ . Este modelo se basa en la observación realizada anteriormente en nuestro laboratorio de que el dominio transportador de la IgAP de *N. gonorrhoeae* forma estructuras oligoméricas en forma de anillo conteniendo aproximadamente 6 subunidades (Veiga *et al.*, 2002). Este modelo es compatible con la translocación de dominios pasajeros parcialmente plegados (Veiga *et al.*, 2004; Skillman *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2009).

**Modelo dependiente del complejo Bam:** a raíz de la aparición de los cristales de los dominios transportadores de los ATs clásicos (Oomen *et al.*, 2004; Barnard *et al.*, 2007) que son monoméricos y con una hélice  $\alpha$  dentro del poro del barril  $\beta$ . Se propuso que ya que el poro del barril estaba obstruido y no se



observaba evidencia de la formación de una estructura oligomérica, alguna otra proteína debería de proporcionar el canal por el que el dominio pasajero atravesaría la ME. Como ya hemos mencionado, el complejo Bam es esencial para la inserción de las proteínas de ME en la misma. Los ATs son proteínas de ME y por tanto se puede presuponer la necesidad del complejo Bam para su inserción. Además el canal formado en la ME por BamA, o por su oligomerización (Surana et al., 2004; Bernstein, 2007), podría permitir a su vez la translocación del dominio pasajero al mismo tiempo. Este modelo, aunque es altamente especulativo, permitiría explicar la secreción de dominios pasajeros plegados y podría ser compatible con la secreción de un modo vectorial (Junker et al., 2009).



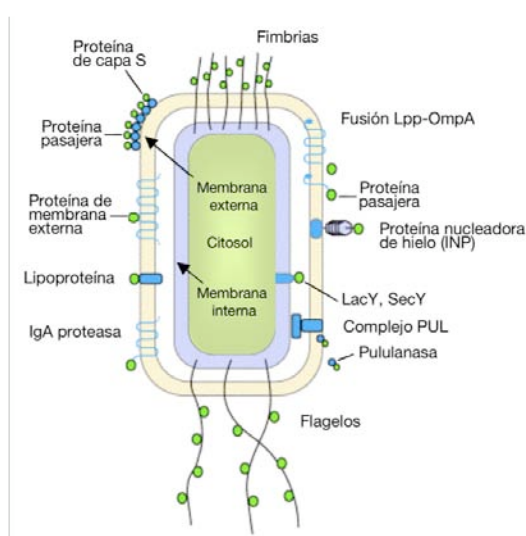
**Figura 9.** Esquema de los modelos de secreción propuestos para Sistemas de Secreción tipo V.

Modelo de secreción en horquilla o vectorial (Pohlner et al., 1987; Loveless y Saier, 1997). Modelo oligomérico que propone una secreción a través del poro del oligómero formado por los dominios transportadores (Veiga et al., 2002). Modelo de secreción dependiente del complejo Bam (Oomen et al., 2004).

En el momento de iniciar este trabajo de tesis doctoral, la única evidencia que apoyaba este modelo era la necesidad de BamA (Omp85) para el plegamiento y autoprocesamiento de la IgAP en *N. meningitidis* (Voulhoux et al., 2003). Sin embargo, la mayoría de las proteínas de la ME de *Neisseria* mostraban una dependencia similar.

## 7. Exposición de proteínas en la superficie de bacterias Gram negativas y sus aplicaciones biotecnológicas.

Se han utilizado los sistemas de secreción, las proteínas de ME y diferentes organelas de superficie, para exponer péptidos y proteínas heterólogas en la superficie de las bacterias Gram negativas (Lee *et al.*, 2003; Samuelson *et al.*, 2002; Wernerus y Stahl, 2004; Jose y Meyer, 2007). También se han empleado fusiones a un péptido señal que permita la translocación a través de la MI para expresar las proteínas en el periplasma.



**Figura 10.** Esquema de los sistemas de exposición en superficie en bacterias Gram negativas.

Los círculos verdes representan la proteína heteróloga fusionada a los distintos sistemas de secreción. Figura adaptada de (Lee et al., 2003).

Muchas de las posibles estrategias están basadas en las fusiones a bucles permisivos de las proteínas de ME que quedan expuestos hacia el exterior de la bacteria (Figura 10). Estas modificaciones están enfocadas a la búsqueda de aplicaciones biotecnológicas e industriales que incluyen entre otras la obtención de cepas bacterianas que expresen en su superficie antígenos de patógenos víricos y/o bacterianos para el desarrollo de vacunas vivas (Yang *et al.*, 2008; Benhar, 2001), la mejora de procesos enzimáticos como la degradación de pesticidas o la biorremediación de contaminantes (Ej. metales pesados) (Wernerus y Stahl, 2004) y la selección desde genotecas de proteínas de unión (p. Ej. anticuerpos) (Fernández, 2004).

### 7.1. Sistemas de exposición: en bacteriófagos (*phage display*) y en bacterias.

El uso de la tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la cápsida de bacteriófagos, *phage display*, es una herramienta muy útil para la selección de interacciones biológicas fuertes desde genotecas con alto número de variantes (Armstrong *et al.*, 1996). En su diseño más simple, una colección de secuencias de DNA que codifican pequeños péptidos (Adey *et al.*, 1996) o proteínas completas (McCafferty y Johnson, 1996), se clonan en fusión N-terminal a la proteína III del bacteriófago M13 (pIII). Estas construcciones se suelen realizar en vectores de clonación denominados fagómidos, con características de un plásmido y de un fago filamentoso, pues contienen los sitios de inicio de la replicación del plásmido y del empaquetamiento del fago. Los fagómidos empleados son por lo general derivados de plásmidos tipo pUC y el fago M13.

Para que la fusión proteína heteróloga-pIII sea empaquetada en la cápsida de un fago M13, la cepa de *E. coli* portadora del fagómido debe infectarse con un fago auxiliar (*helper*) que proporciona los elementos necesarios para formar el virión completo. Tras la infección con el virus auxiliar de un cultivo de células de *E. coli* que expresan el fagómido, los bacteriófagos resultantes contienen en su cápsida una o varias copias de la pIII, en las que las secuencias peptídicas heterólogas clonadas se presentan como híbridos de fusión al extremo N-terminal. Esta colección de bacteriófagos se puede incubar con un “antígeno” concreto de interés, ya sea de naturaleza proteica o no, para recuperar aquellos que son capaces de unirse a él (selección) (Griffiths y Duncan, 1998; Hoogenboom, 2005). Una reinfección de un cultivo de *E. coli* con los bacteriófagos que se han unido al antígeno permite la amplificación de los virus que codifican las secuencias de interés capaces de reconocer el antígeno deseado. Mediante *phage display* se han seleccionado péptidos y otro tipo de dominios de unión (anticuerpos recombinantes) con alta afinidad frente a receptores y proteína celulares (Azriel-Rosenfeld *et al.*, 2004; Doobar y Winter, 1994; Sparks *et al.*, 1994), virus (Ho y Segre, 2003) o anticuerpos monoclonales (Wright *et al.*, 1995).

Nosotros estamos interesados en desarrollar sistemas de ***bacterial display*** para *E. coli* basados en los dominios transportadores de SST5. Estos sistemas nos permitirían presentar en la superficie de las bacterias péptidos y proteínas con capacidad de interaccionar con un antígeno específico y seleccionar las moléculas de unión directamente. Las genotecas de *bacterial display* pueden alcanzar una variabilidad práctica máxima de  $10^9$  clones. En el caso de *phage display* el tamaño puede ser varios órdenes de magnitud superior. Sin embargo el menor tamaño de una genoteca de *bacterial display* no es un inconveniente cuando partimos de animales inmunizados con el antígeno de interés, ya que  $10^6$  clones supone suficiente variabilidad para realizar la selección de anticuerpos de alta afinidad. Por último, el *bacterial display* permite hacer la selección en solución, empleando el FACS-sorter (*fluorescent activated cell sorting*) (Jose, 2006) o MACS (*magnetic cell sorting*) (Etz et al., 2001), no siendo necesario fijar el antígeno a ninguna superficie.

### **7.2. Sistemas de exposición asociados a membrana externa y organelas (*bacterial display*).**

El desarrollo de nuevos sistemas que nos permitan la exposición en la superficie bacteriana de proteínas de interés, *bacterial display*, es muy importante para aplicaciones biotecnológicas en las que utilicemos las bacterias como vehículo de transporte y selección de proteínas desde genotecas de variantes. La mayoría de los sistemas emplean proteínas de ME para exponer proteínas en la superficie de las bacterias Gram negativas (Lang, 2000). Los primeros trabajos se llevaron a cabo con la proteína OmpA. OmpA mostraba una alta homología de secuencia entre distintas cepas, observándose las mayores diferencias en los aa situados en los bucles expuestos en la superficie de la bacteria. Por ello se emplearon dichos bucles como dianas para la inserción de secuencias cortas de aa (Samuelson et al., 2002). El uso de los bucles permisivos de las proteínas de ME se ha llevado a cabo también en otras proteínas de ME como LamB, OmpC, PhoE de *E. coli*, OprF de *P. aeruginosa* y OmpS de *V. cholerae* entre otras. La mayor limitación de este sistema es que no suele permitir la inserción de péptidos de un tamaño superior a 60 aa (Samuelson et al., 2002).

Otra estrategia ampliamente usada es la fusión al C-terminal de la proteína híbrida Lpp-OmpA, compuesta por el péptido señal y los primeros 8 aa de la proteína Lpp (lipoproteína de Braun), que ancla la construcción a la ME, y los aa del 46 al 159 de OmpA (Valls *et al.*, 1998; Earhart, 2000). Dominios de hasta 40 kDa se han expuesto sobre la superficie de *E. coli* gracias a este sistema. Se han llevado a cabo fusiones a otras lipoproteínas como PAL, lipoproteína asociada al PG de *E. coli* (Samuelson *et al.*, 2002).

La proteína nucleadora del hielo (Inp) de *P. syringae* también se ha usado para la exposición en superficie de polipéptidos heterólogos. Esta proteína posee un motivo glicosil-fostatidilinositol (GPI) de anclaje a la membrana que es típico de células eucariotas (Cornelis, 2000; Wu *et al.*, 2006).

Otros trabajos han usado las subunidades estructurales de flagelos y fimbrias de bacterias Gram negativas para la exposición de péptidos o proteínas heterólogas. Es fundamental localizar sitios permisivos en la subunidad estructural para poder insertar los polipéptidos heterólogos manteniéndose la capacidad de ensamblaje de estas subunidades quiméricas en la organela.

En los flagelos se han expuesto proteínas heterólogas principalmente empleando la subunidad estructural mayoritaria FliC y también en FliD (Hynonen *et al.*, 2002; Majander *et al.*, 2005). Diferentes tipos de fimbrias se han utilizado tanto en cepas de *E. coli* como en otras enterobacterias. Entre los tipos de fimbrias utilizados se incluyen las fimbrias P (van Die *et al.*, 1990; van der Zee *et al.*, 1995), fimbrias K 88 (Bakker *et al.*, 1990) y fimbrias tipo IV (Jennings *et al.*, 1989).

También los ATs se habían utilizado previamente a este trabajo en nuestro laboratorio y en otros grupos para la exposición de péptidos y dominios heterólogos en la superficie de las bacterias mediante construcciones híbridas donde el pasajero nativo es sustituido por estos dominios (Jose y Meyer, 2007). Algunos ejemplos de péptidos y dominios secretados por el dominio transportador de un ATs son: la metalotioneína-2 (MT2) de rata (Valls *et al.*,

2000), el dominio lectina de FimH (Kjaergaard *et al.*, 2002) y algunos anticuerpos recombinantes en formato *single-chain* Fv y *Nanobody* (Veiga *et al.*, 1999; Veiga *et al.*, 2004).

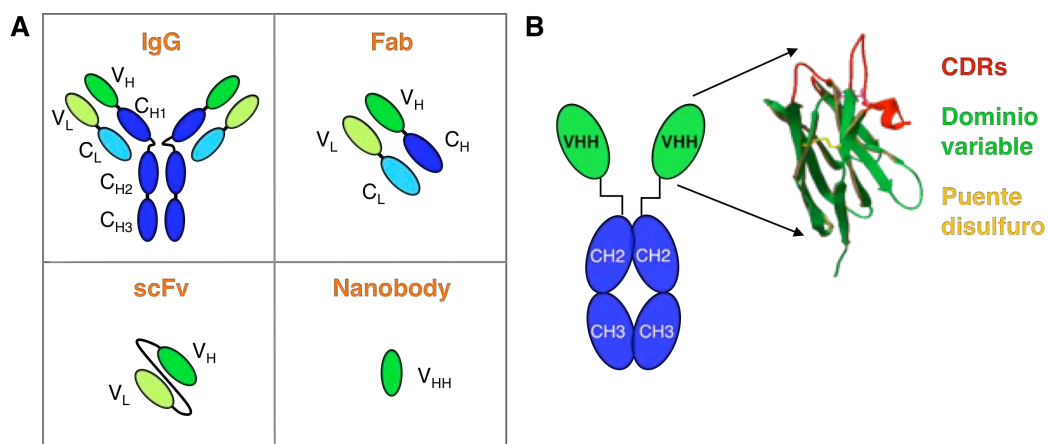
### 7.3. Anticuerpos recombinantes y su selección.

Los anticuerpos recombinantes son fragmentos derivados de los anticuerpos naturales construidos por tecnología del DNA recombinante. Pese a su menor tamaño, conservan intacta la capacidad de unión al antígeno (epítipo) ya que mantienen los dominios Ig variables (V), que codifican los CDRs (regiones codificantes de complementariedad) que constituyen el paratopo (dominio responsable del reconocimiento antigénico). Precisamente su pequeño tamaño facilita su expresión en bacterias y en vectores de *phage display* (Plückthun *et al.*, 1996).

Los anticuerpos recombinantes más utilizados son los fragmentos de unión al antígeno Fab (*fragment antibody binding*) formados por dos dominios variables,  $V_H$  y  $V_L$ , y dos constantes,  $C_{H1}$  y  $C_L$ ; los monocadena de la fracción variable scFv (*single chain variable fragment*) formados por los dominios variables ( $V_H$  y  $V_L$ ) unidos covalentemente entre sí por un péptido corto y flexible; y los anticuerpos monodominio (*heavy chain antibody* o *Nanobody*,  $V_{HH}$ ), que son los anticuerpos recombinantes funcionales de menor tamaño, formados por un único dominio variable de la cadena pesada (Fernández, 2004) (Figura 11).

Los *Nanobodies* provienen de una subfamilia de anticuerpos de la familia de los camélidos (p. Ej. camellos, dromedarios, llamas y alpacas) (Conrath *et al.*, 2003). Dicha subfamilia de anticuerpos se caracteriza por carecer de cadena ligera (Hamers-Casterman *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 2000) y por ello el paratopo de estos anticuerpos sólo está formado por los 3 CDRs del segmento variable de la cadena pesada (denominado  $V_{HH}$  o *heavy-chain-only*  $V_H$ ). La longitud de los CDRs de un  $V_{HH}$  suele ser mayor que la de los dominios  $V_H$  convencionales. Además debido a su pequeño tamaño (~15 kDa) y a cambios en las regiones hidrofóbicas que interaccionan con la cadena ligera en un  $V_H$  convencional, los

$V_{HH}$  poseen una mayor estabilidad y solubilidad (Dumoulin *et al.*, 2002). Los *Nanobodies* son por tanto capaces de interaccionar con los surcos y oquedades de las proteínas, lo que les hace excelentes inhibidores de las actividades enzimáticas (Lauwereys *et al.*, 1998; Conrath *et al.*, 2001). Además presentan una alta similitud a nivel de secuencia con la subfamilia de anticuerpos  $V_{H3}$  humanos lo que abre la posibilidad de aplicaciones en terapia y diagnóstico en humanos (Holliger y Hudson, 2005).



**Figura 11.** Estructura esquemática de los anticuerpos recombinantes más comunes.

**A.** Anticuerpos recombinantes Fabs, scFvs y *Nanobody*. Como referencia se muestra el esquema de la estructura de una molécula de IgG. Figura modificada de (Fernández, 2004). **B.** Esquema de los anticuerpos de camélidos y estructura 3D de un dominio  $V_{HH}$  (Spinelli *et al.*, 2001). Los dominios constantes (C) se muestran en azul y los variables (V) en verde, en rojo se marcan los CDRs y en amarillo el puente disulfuro central del dominio variable. H indica la cadena pesada (*heavy*) y L la cadena ligera (*light*).





## **OBJETIVOS**



1. Caracterizar el dominio transportador en los autotransportadores clásicos y su relación estructura-función.
2. Determinar el papel de las chaperonas periplásmicas y el complejo Bam en el plegamiento e inserción en la membrana externa del dominio transportador de los autotransportadores clásicos.
3. Búsqueda de proteínas celulares implicadas en el proceso de autotransporte.
4. Caracterizar el dominio transportador de Intimina y su relación estructura-función.
5. Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas de los SST5 en la selección de anticuerpos recombinantes presentados en la superficie de *E. coli* (*bacterial display*).



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Cepas bacterianas.

Un listado de las estirpes utilizadas en este trabajo y su genotipo se detalla en la Tabla 1.

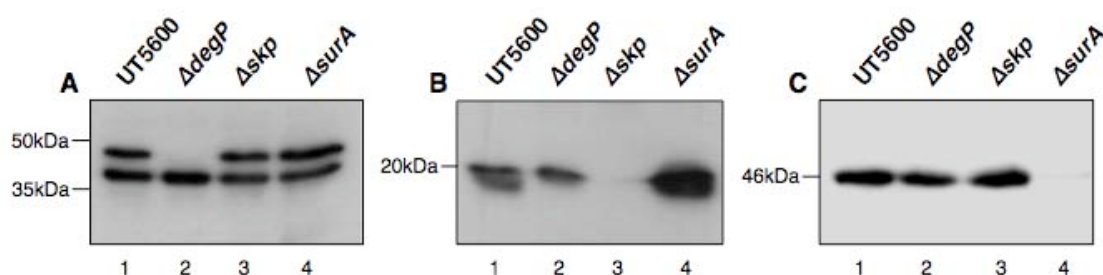
**Tabla 1.** Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
<b>Cepas de <i>E. coli</i> K12</b>		
UT5600	F <sup>-</sup> ara-14 leuB6 secA6 lacY1 proC14 tsx-67 $\Delta$ (ompT-fepC)266 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109(Str R) xyl-5 mtl-1 thi-1	(Grodberg y Dunn, 1988)
UTdegP	UT5600 $\Delta$ araC degP::km	Colección del laboratorio
UTdegP-P <sub>BAD</sub> ::bamA	UT5600 $\Delta$ araC degP::km zeo <sup>R</sup> araC P <sub>BAD</sub> ::bamA	Colección del laboratorio
UTdegP-P <sub>BAD</sub> ::surA	UT5600 $\Delta$ araC degP::km zeo <sup>R</sup> araC P <sub>BAD</sub> ::surA	Colección del laboratorio
UTdsbA (JK321)	UT5600 zih12::Tn10 dsbA::km1	(Jose et al., 1996)
UTfkpA	UT5600 fkpA::km	(Veiga et al., 2004)
UTP <sub>BAD</sub> ::bamA	UT5600 $\Delta$ araC zeo <sup>R</sup> araC P <sub>BAD</sub> ::bamA	Colección del laboratorio
UTskp	UT5600 skp::km	Colección del laboratorio
UTsurA	UT5600 surA::km	Colección del laboratorio
XL-1 Blue	recA1 gyrA96 relA1 endA1 hsdR17 supE44 thi1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> lacZDM15 Tn10] Tc <sup>r</sup>	Stratagene (Bullock et al., 1987)
<b>Otras cepas</b>		
<i>Brucella abortus</i> 2308		Cepa tipo. (Manthei, 1950)
EHEC EDL933 stx-	<i>E. coli</i> enterohemorrágico EHEC O157:H7 ( $\Delta$ stx1 $\Delta$ stx2)	(McDaniel et al., 1995)

EPEC 2348/69	<i>E. coli</i> enteropatógeno O127:H6	EPEC	(McDaniel et al., 1995)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) omp8	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup></i> <i>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal dcm</i> (DE3) $\Delta$ <i>lamB</i> <i>ompF::Tn5</i> $\Delta$ <i>ompA</i> $\Delta$ <i>ompC</i>		(Prilipov et al., 1998)

### Construcción de las cepas UTskp, UTsurA y UTdegP.

Realizamos mutantes en las chaperonas periplásmicas en un fondo *E. coli* UT5600 en el caso de UTskp y UTsurA, mientras que para UTdegP el fondo era una cepa *E. coli* UT5600  $\Delta$ *araC*. Empleamos el método de reemplazamiento génico descrito en (Datsenko y Wanner, 2000). La construcción de estas cepas ha sido descrita en (Bodelon et al., 2009). El mutante UTfkpA ha sido descrito anteriormente (Veiga et al., 2004). Comprobamos que todas las cepas mutantes crecen correctamente en placas de LB suplementadas con 1% SDS, excepto  $\Delta$ *surA*, lo que corrobora su fenotipo (Sklar et al., 2007b) y realizamos *Western blot* con anticuerpos específicos contra cada una de las chaperonas (Figura 12). Además, comprobamos la disminución de OmpA, OmpC, OmpF y LamB mediante fraccionamiento subcelular en el extracto de ME de la cepa mutante en *surA*. En el resto de las cepas no se aprecian diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre (resultados no mostrados).



**Figura 12.** Caracterización fenotípica de los mutantes nulos *degP*, *skp* y *surA* en *E. coli*.

*Western blot* de extractos celulares de *E. coli* UT5600 y sus mutantes isogénicos *degP*, *skp* y *surA* con sueros policlonales que reconocen DegP (A), Skp (B) y SurA (C). El anti-DegP reconoce también la MBP (proteína de unión a maltosa) porque en la síntesis del anticuerpo se utilizó como antígeno la proteína de fusión DegP-MBP. El tamaño de DegP es 48 kDa y MBP 42 kDa.



### Construcción de las cepas $UTP_{BAD}::bamA$ , $UTdegP-P_{BAD}::bamA$ y $UTdegP-P_{BAD}::surA$ .

La cepa  $UTP_{BAD}::bamA$  se construyó sobre un fondo *E. coli* UT5600  $\Delta araC$ . Las otras dos cepas se construyeron sobre el mutante  $UTdegP$  construido previamente. La creación de los tres mutantes condicionales se basa en el reemplazamiento del promotor natural de *bamA* y *surA* por el promotor *araC*- $P_{BAD}$ , obtenido por recombinación homóloga del DNA lineal  $\lambda red$  que contiene el cassette *zeoRExBAD* (cedido por el Dr. JM Ghigo) (Roux *et al.*, 2005). Gracias a ello podemos llevar a cabo la inducción de los genes que queremos estudiar con 0,4% (p/v) L-(+)-arabinosa y reprimirlos con 0,4% (p/v) glucosa. La construcción de estas cepas ha sido descrita en (Bodelon *et al.*, 2009).

## 2. Plásmidos.

En la Tabla 2 aparecen todos los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes. La Tabla 3 incluye una breve descripción de la construcción de los nuevos plásmidos realizados para este trabajo y en la Tabla 4 aparece el listado de los oligonucleótidos utilizados.

Los oligonucleótidos sintéticos se obtuvieron de Sigma-Genosys. Todas las construcciones se revisaron por secuenciación de DNA usando el método de los dideoxinucleótidos y un secuenciador de DNA automático ABI-PRISM (Perkin Elmer). Las técnicas generales de DNA recombinante se llevaron a cabo según métodos estándar (Ausubel *et al.*, 1994). Las reacciones de PCR realizadas en este trabajo han sido realizadas con Vent DNA polimerasa (New England Biolabs).

**Tabla 2.** Listado de plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pOmpG	Ap <sup>r</sup> , derivado de pB22, expresa la porina OmpG con 6 histidinas C-terminales	(Subbarao y van den Berg, 2006)
pAK-Not (pAK)	Cm <sup>r</sup> , vector vacío sin inserto y diana Not I; contiene <i>lacI</i> <sup>Q</sup> - <i>plac</i> y <i>ori</i> pBR322	(Veiga <i>et al.</i> , 1999)

pCALOH	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa una fusión del péptido señal <i>pelB</i> con C-EhaA, residuos 807-1327; contiene etiquetas 6xHis y E-tag	Colección del laboratorio
pC-AspA	Ap <sup>r</sup> , derivado de pCRT7/NT-TOPO, expresa C-AspA (NalP) de <i>N. meningitidis</i> MC58, residuos 662-1082. Dominio transportador idéntico 100% al de NalP	(Turner <i>et al.</i> , 2002; Henderson <i>et al.</i> , 2004)
pFosβ	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa una fusión del péptido señal <i>pelB</i> con la cremallera de leucinas de c-Fos fusionada a C-IgAP, residuos 1124-1532, con etiqueta E-tag	(Veiga <i>et al.</i> , 2003a)
pHEA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa una fusión del péptido señal <i>pelB</i> con C-EhaA, residuos 989-1327, con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo
pHEBA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa una fusión del péptido señal <i>pelB</i> con C-BruA, residuos 3085-3422, con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo
pHEI	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa una fusión del péptido señal <i>pelB</i> con C-IgAP, residuos 1226-1532, con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo
pHEN	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa una fusión del péptido señal <i>pelB</i> con C-NalP, residuos 777-1084, con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo
pHES	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa una fusión del péptido señal <i>pelB</i> con C-ShdA, residuos 1720-2039, con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo
pHEV	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa una fusión del péptido señal <i>pelB</i> con C-VacA, residuos 915-1287, con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo
pHEβ	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pCorβ expresa C-IgAP, residuos 1124-1532, con etiquetas 6xHis y E-tag	(Veiga <i>et al.</i> , 2002)
pInt522	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pNeae, expresa los 522 primeros aa de Intimina con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo
pInt535	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pNeae, expresa los 535 primeros aa de Intimina con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo

pInt550	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pNeae, expresa los 550 primeros aa de Intimina con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo
pJunA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pHEA, expresa C-EhaA fusionado a la cremallera de leucinas de c-Jun y etiqueta E-tag	Este trabajo
pJunAI	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunI, expresa C-IgAP con la hélice $\alpha$ de EhaA	Este trabajo
pJunBA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pHEBA, expresa C-BruA fusionado a la cremallera de leucinas de c-Jun y etiqueta E-tag	Este trabajo
pJundA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunA, expresa C-EhaA sin la hélice $\alpha$	Este trabajo
pJundBA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunBA, expresa C-BruA sin la hélice $\alpha$	Este trabajo
pJundI	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunI, expresa C-IgAP sin la hélice $\alpha$	Este trabajo
pJundN	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunN, expresa C-NalP sin la hélice $\alpha$	Este trabajo
pJundS	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunS, expresa C-ShdA sin la hélice $\alpha$	Este trabajo
pJunI	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pHE $\beta$ , expresa C-IgAP fusionado a la cremallera de leucinas de c-Jun y etiqueta E-tag	Este trabajo
pJunIA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunA, expresa C-EhaA con la hélice $\alpha$ de IgAP	Este trabajo
pJunIN	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunN, expresa C-NalP con la hélice $\alpha$ de IgAP	Este trabajo
pJunN	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pHEN, expresa C-NalP fusionado a la cremallera de leucinas de c-Jun y etiqueta E-tag	Este trabajo
pJunNA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunA, expresa C-EhaA con la hélice $\alpha$ de NalP	Este trabajo
pJunNI	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunI, expresa C-IgAP con la hélice $\alpha$ de NalP	Este trabajo

pJunS	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pHES, expresa C-ShdA con la cremallera de leucina de c-Jun y E-tag	Este trabajo
pJunSA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pJunA, expresa C-EhaA con la hélice $\alpha$ de ShdA	Este trabajo
pJun $\beta$	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa una fusión <i>peIB</i> con la cremallera de leucinas de c-Jun fusionada a C-IgAP, residuos 1124-1532, con etiqueta E-tag	(Veiga et al., 2003a)
pKD4	Apr, Kmr, oriR $\gamma$ . Resistencia a Km flanqueada por secuencias FRT	(Datsenko y Wanner, 2000)
pKD46	Apr, oriR101, repA101(ts). Codifica la maquinaria de recombinación del fago $\lambda$ . GenBank AY048746	(Datsenko y Wanner, 2000)
pLOF	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , derivado de pBOR8, contiene un miniTn10::Km	(Herrero et al., 1990)
pMT $\beta$	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pHE $\beta$ , expresa C-IgAP fusionado a la metalotioneína	(Veiga et al., 2003b)
pNeae	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; expresa el péptido señal propio y los 550 primeros aa junto con el dominio D0 de la Intimina de EHEC (GenBank AAG58823), con etiquetas 6xHis y E-tag	Este trabajo
pNeae-VHHTirM	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de Neae, expresa un V <sub>HH</sub> con afinidad por TirM, flanqueado por las etiquetas E-tag y myc-tag fusionado a Neae	Este trabajo
pNeaeVHH (pNeae-VHHFib)	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de Neae, expresa un V <sub>HH</sub> con afinidad por fibrinógeno, flanqueado por etiquetas E-tag y myc-tag fusionado a Neae	Este trabajo
pT1-VacA	Ap <sup>r</sup> , derivado de pT1, expresa C-VacA de <i>H. pylori</i> 60190, residuos 854-1287	(Nguyen et al., 2001)
pVHH-A (VHHFib-A)	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pHEA, expresa un V <sub>HH</sub> con afinidad por fibrinógeno fusionado a C-EhaA	Este trabajo
pVHH-BA	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pVHH-A, expresa un V <sub>HH</sub> con afinidad por fibrinógeno fusionado a C-BruA	Este trabajo

pVHH-I	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pVHH-A, expresa un V <sub>HH</sub> con afinidad por fibrinógeno fusionado a C-IgAP	Este trabajo
pVHH-N	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pVHH-A, expresa un V <sub>HH</sub> con afinidad por fibrinógeno fusionado a C-NaIP	Este trabajo
pVHH-S	Cm <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pVHH-A, expresa un V <sub>HH</sub> con afinidad por fibrinógeno fusionado a C-ShdA	Este trabajo
pVHHTirM-A	Sp <sup>r</sup> , vector pAK; derivado de pHEA, expresa un V <sub>HH</sub> con afinidad por TirM fusionado a C-EhaA	Este trabajo
pVShdA	Sp <sup>r</sup> , vector pVLT35; expresa ShdA <i>wt</i>	Colección del laboratorio

**Tabla 3.** Construcción de los plásmidos.

Plásmido	Construcción
pHEA	En el plásmido pHEβ digerido <i>HindIII/SacII</i> se insertó un fragmento de PCR que codifica el dominio C-terminal del AT EhaA obtenido a partir de pCALOH con los oligonucleótidos H3-ALOH y Sac2-ALOH, digerido <i>HindIII/SacII</i> .
pHEBA	En el plásmido pHEβ digerido <i>HindIII/SacII</i> se insertó un fragmento de PCR que codifica el dominio C-terminal del AT BruA obtenido a partir del genómico de <i>B. abortus</i> 2308 con los oligonucleótidos Sac2tromBA y H3BA, digerido <i>HindIII/SacII</i> .
pHEI	En el plásmido pHEβ digerido <i>HindIII/SacII</i> se insertó un fragmento de PCR que codifica el dominio C-terminal del AT IgAP obtenido a partir de pJunI con los oligonucleótidos Sac2tromIgAP y pAK-directo, digerido <i>HindIII/SacII</i> .
pHEN	En el plásmido pHEβ digerido <i>HindIII/SacII</i> se insertó un fragmento de PCR que codifica el dominio C-terminal del AT NaIP obtenido a partir de pC-AspA con los oligonucleótidos Sac2tromNP y H3NP, digerido <i>HindIII/SacII</i> .
pHES	En el plásmido pHEβ digerido <i>HindIII/SacII</i> se insertó un fragmento de PCR que codifica el dominio C-terminal del AT ShdA obtenido a partir de pVShdA con los oligonucleótidos Sac2tromShdA y H3ShdA, digerido <i>HindIII/SacII</i> .
pHEV	Se amplificó el dominio C-terminal del AT VacA de <i>H. pylori</i> 60190 a partir de pT1-VacA con los oligos Sac2tromVacA y VacA-NotI. Dicho producto de PCR se digirió <i>SacII/NotI</i> y se llevó a cabo una ligación

	triple con los fragmentos de digirir pMT $\beta$ <i>XbaI/NotI</i> y pHE $\beta$ <i>XbaI/SacII</i> .
pInt522	En el plásmido pNeae digerido <i>XbaI/SfiI</i> se insertó un fragmento de PCR que codifica para los 522 primeros aa de la Intimina obtenido a partir de pNeae con los oligonucleótidos Xba1Neae e IntSfi2, digerido <i>XbaI/SfiI</i> .
pInt535	En el plásmido pNeae digerido <i>XbaI/SfiI</i> se insertó un fragmento de PCR que codifica para los 535 primeros aa de la Intimina obtenido a partir de pNeae con los oligonucleótidos Xba1Neae e IntSfi1, digerido <i>XbaI/SfiI</i> .
pInt550	En el plásmido pNeae digerido <i>XbaI/SfiI</i> se insertó un fragmento de PCR que codifica para los 550 primeros aa de la Intimina obtenido a partir de pNeae con los oligonucleótidos Xba1Neae e IntSfiNco, digerido <i>XbaI/SfiI</i> .
pJunA	En el plásmido pHE $\beta$ digerido <i>XbaI/HindIII</i> se insertó el fragmento de la digestión <i>XbaI/HindIII</i> de pHEA.
pJunBA, pJunN, pJunS	Del mismo modo que la construcción anterior, insertando el fragmento de la digestión <i>XbaI/HindIII</i> de cada uno de estos plásmidos, en el plásmido pHE $\beta$ digerido <i>XbaI/HindIII</i> .
pJunI	En el plásmido pJun $\beta$ digerido <i>SacII/HindIII</i> se insertó un fragmento de PCR obtenido a partir de pHE $\beta$ con los oligonucleótidos IgAP-D1 y pAK-directo, digerido <i>SacII/HindIII</i> .
pJunAI	Mediante una PCR de fusión realizamos la sustitución de la hélice $\alpha$ de la IgAP por la de EhaA. Dicho fragmento se digirió <i>SacII/HindIII</i> y se sustituyó en el plásmido pJunI digerido con las mismas enzimas.  Realizamos en un primer paso: PCR-A con los oligos ALOH-IgAP1 y ALOH-IgAP2, como molde pHEA, y PCR-B con los oligos ALOH-IgAP3 y H3-IgAP, como molde pHEI. Segundo paso, mezclamos los productos de la PCR-A y la PCR-B, sin oligos, para que ocurra el ensamblaje. Purificamos de un gel de agarosa el producto de dicha PCR. Tercer paso, realizamos una PCR con los oligos ALOH-IgAP1 y H3-IgAP sobre el producto de la PCR de ensamblaje para amplificarlo.
pJundA	En el plásmido pJunA digerido <i>SacII/HindIII</i> se insertó un fragmento de PCR obtenido a partir de pHEA con los oligonucleótidos ALOH-D1 y pAK-directo, digerido <i>SacII/HindIII</i> .
pJundBA	En el plásmido pJunA digerido <i>SacII/HindIII</i> se insertó un fragmento de PCR obtenido a partir de pHEBA con los oligonucleótidos pAK-directo y BruA-D1, digerido <i>SacII/HindIII</i> .
pJundI	En el plásmido pJunA digerido <i>SacII/HindIII</i> se insertó un fragmento de PCR obtenido a partir de pJunI con los oligonucleótidos IgAP-D2 y pAK-directo, digerido <i>SacII/HindIII</i> .
pJundN	En el plásmido pJunA digerido <i>SacII/HindIII</i> se insertó un fragmento de PCR obtenido a partir de pJunN con los oligonucleótidos NalP-D1 y H3NP, digerido <i>SacII/HindIII</i> .

pJundS	En el plásmido pJunA digerido <i>SacII/HindIII</i> se insertó un fragmento de PCR obtenido a partir de pJunS con los oligonucleótidos ShdA-D1 y H3ShdA, digerido <i>SacII/HindIII</i> .
pJunIA	Siguiendo el protocolo descrito para pJunAI. PCR-A con los oligos IgAP-ALOH1 y IgAP-ALOH2, como molde pHE $\beta$ . PCR-B con los oligos IgAP-ALOH3 y H3-ALOH, como molde pHEA.
pJunIN	Siguiendo el protocolo descrito para pJunAI. PCR-A con los oligos IgAP-ALOH1 y IgAP-NalP2, como molde pHE $\beta$ . PCR-B con los oligos IgAP-NalP3 y pAK-directo, como molde pHEN.
pJunNA	Siguiendo el protocolo descrito para pJunAI. PCR-A con los oligos NalP-IgAP1 y NalP-ALOH2, como molde pHEN. PCR-B con los oligos NalP-ALOH3 y H3-ALOH, como molde pHEA.
pJunNI	Siguiendo el protocolo descrito para pJunAI. PCR-A con los oligos NalP-IgAP1 y NalP-IgAP2, como molde pHEN. PCR-B con los oligos NalP-IgAP3 y pAK-directo, como molde pHE $\beta$ .
pJunSA	Siguiendo el protocolo descrito para pJunAI. PCR-A con los oligos ShdA-ALOH1 y ShdA-ALOH2, como molde pHES. PCR-B con los oligos NalP-ALOH3 y H3-EhaA, como molde pHEA.
pNeae	Se amplificó el dominio-N de la Intimina de <i>E. coli</i> O157:H7 (EHEC) mediante una PCR con los oligos Xba1Neae y Ba1Neae. Dicho producto de PCR se digirió <i>XbaI/BamHI</i> y se llevó a cabo una ligación tripe con el fragmento de digerir pHE $\beta$ <i>XbaI/HindIII</i> y el producto de la PCR con los oligos BaEtaghis2 y NotEtaghis2.
pNeae-VHH (pNeae-VHHFib, pNeae-VHHTir)	En el plásmido pNeae digerido <i>SfiI/NotI</i> se insertó el fragmento de PCR obtenido a partir de pVHH-A con los oligonucleótidos VHHSfi2 y VHHmycNot, digerido <i>SfiI/NotI</i> .
pVHH-A (pVHHFib-A, pVHHTir-A)	En el plásmido pHEA digerido <i>SfiI/NotI</i> se insertó el fragmento de la digestión <i>SfiI/NotI</i> de los vectores de <i>phage display</i> que contienen los V <sub>HH</sub> que reconocen fibrinógeno y TirM respectivamente.
pVHH-S, pVHH-I, pVHH-N, pVHH-BA	Del mismo modo que la construcción anterior, digiriendo los plásmidos pHES, pHEI, pHEN y pHEBA con <i>SfiI/NotI</i> , se insertó el fragmento de la digestión <i>SfiI/NotI</i> de pVHHFib-A.

**Tabla 4.** Listado de oligos.

Nombre	Secuencia
ALOH-D1	5'-TCCCCGCGGACCGACATGGTGACGGGTGAG-3'
ALOH-IgAP1	5'-TCCCCGCGGGGTAGCTACATTGCGAACCTTGC-3'
ALOH-IgAP2	5'-TGACATCCAAACACTGTTTCATAGTGGTTTGTCTGCTCACC-3'

ALOH-IgAP3	5'-AACAGTGTGGATGTCAAAC-3'
ARB1	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT-3'
ARB2	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
Ba1Neae	5'-GGTACGGATCCGGATACGGCACCGGCGCACCATCAAAAAATATAAC CGCACTGGC-3'
BaEtaghis2	5'-GATCCGCTGGAACCGGCCAGCCGGCCATGGCGCATCACCATCAC CATCACGCGGCCGCTTA-3'
BruA-D1	5'-GATTCCCCGCGGGTCTGGGCCAAGCACCTGTGCCTG-3'
H3-ALOH	5'-GTCAAGCTTTCAGAATTGCCACTTAATGCC-3'
H3-BA	5'-CGGGCAGGAAGCTTCTACCAACGTACGCGCAGACCCACA-3'
H3-IgAP	5'-GTCAAGCTTGAGTTCAGACGGCATTATT-3'
H3-NP	5'-CGGGCAGGAAGCTTTCAGAACCGGTAGCCTACGCCGACT-3'
H3-ShdA	5'-CGGGCAGGAAGCTTCCGCCCCGGTTTTGTCTAAC-3'
IgAP-ALOH1	5'-TCCCCGCGGGCGCAAGCCGATGCAGTCAGCAC-3'
IgAP-ALOH2	5'-ACCTTCATGGCGCATCCATTTTTCGGCATCAGCGCGTGA-3'
IgAP-ALOH3	5'-TGGATGCGCCATGAAGGTGGTC-3'
IgAP-D1	5'-TCCCCGCGGTTACAACCAAGAGCCGCGCAG-3'
IgAP-D2	5'-TCCCCGCGGCGCGCTGATGCCGAAAAAAC-3'
IgAP-NalP2	5'-TTGGGTTTGCGCGATGACGCGCAGTTTTTCGGCATCAGCGCGTG-3'
IgAP-NalP3	5'-CTGCGGTCATCGCGCAAACCCAAC-3'
IntSfi1	5'-GTGATGCGCCATGGCCGGCTGGGCCGGTTCCAGCGGATCCGGATA CGGCACCGGATTACGGTCATAGGCGCG-3'
IntSfi2	5'-GTGATGCGCCATGGCCGGCTGGGCCGGTTCCAGCGGATCCGGATA CGGCACCGGGCTGCCACCTTGACATAAGC-3'
IntSfiNco	5'-GTGATGCGCCATGGCCGGCTGGGCCGGTTCCAGCGGATCCGGATA CGGCACCGGCGCCGACAG-3'
mTn10-1	5'-ATTGGTTAATTGGTTGTAACACTG-3'
mTn10-2	5'-GCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGA-3'
mTn10-3	5'-GATATATTTTATCTTGTGCAATGTA-3'



mTn10-4	5'-ACATCAGAGATTTTGAGACACAACGT-3'
NalP-ALOH2	5'-ATGACCACCTTCATGGCGCATCCAACCCGTGCCGTTGTGGTC-3'
NalP-ALOH3	5'-TGGATGCGCCATGAAGGTGGTCAT-3'
NalP-D1	5'-TCCCCGCGGAACGGCACGGGTCTGCGCGTC-3'
NalP-IgAP1	5'-TCCCCGCGGGCCGCTACCGTCTATGCCGAC-3'
NalP-IgAP2	5'-GGTGTTTGACATCCAAACACTGTTACCCGTGCCGTTGTGGTCCAAC-3'
NalP-IgAP3	5'-AACAGTGTTTGGATGTCAAACACC-3'
NotEtaghis2	5'-AGCTTAAGCGGCCGCGTGATGGTGATGGTGATGCGCCATGGCCGGCTGGGCCGGTTCCAGCG-3'
pAK-directo	5'-GTGACGCAGTAGCGGTAAACGGCAGAC-3'
Sac2-ALOH	5'-GTTCCCCGCGGACACCTACGCCGGGTCCGGAT-3'
Sac2tromBA	5'-GTTCCCCGCGGCTGGTTCCGCGTGGTTCCCCGACGGACCCCGAAA CACCGCTTTA-3'
Sac2tromIgAP	5'-GTTCCCCGCGGCTGGTTCCGCGTGGTTCCCTACAACCAAGAGCCG CGCAG-3'
Sac2tromNP	5'-GTTCCCCGCGGCTGGTTCCGCGTGGTTCCGACGGTGTACGCATCT TCAACAGTCT-3'
Sac2tromShdA	5'-GTTCCCCGCGGCTGGTTCCGCGTGGTTCCGGCGGCGATGTCGCAC CGCAGTACCG-3'
Sac2tromVacA	5'-GTTCCCCGCGGCTGGTTCCGCGTGGTTCCAGCCATGATGCGGGTT ATGCC-3'
ShdA-ALOH1	5'-TCCCCGCGGGGCGATGTCGCACCGCAGTAC-3'
ShdA-ALOH2	5'-ATGACCACCTTCATGGCGCATCCAATCGGCATTACGATACTGGCTG-3'
ShdA-D1	5'-TCCCCGCGGCGCGAGGGCAGCCAGTATCGT-3'
VacA-NotI	5'-GAGTCATTCTGCGGCCGCTTAGAAACTATACCTCATTCTAAATTGG-3'
VHHmycNot	5'-GGACTAGTGCGGCCGCATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTGAG GAGACGGTGACCTGGGT-3'
VHHSfi2	5'-GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCTCAGGTGCAGCTG GTGGA-3'

---

Xba1Neae	5'-GCGTATCTAGATAACGAGGGCAAATCATGATTACTCATGGTTGTTAT ACC-3'
----------	--

---

### 3. Condiciones de cultivo e inducción.

Usamos la cepa de *E. coli* XL-1 blue como huésped en la construcción de los clonajes elaborados para este trabajo (Bullock et al., 1987). Crecimos la cepa a 30 °C en medio líquido Luria Bertani (LB; (Miller, 1992)) o placas de LB-agar, con los antibióticos requeridos y glucosa (2% p/v) para la represión de los promotores Plac y P<sub>BAD</sub>.

*E. coli* UT5600 y todas las estirpes derivadas de ésta que son mutantes nulos, las crecimos a 30 °C en placas de LB-agar que contenían glucosa (2% p/v) y, para el mantenimiento y selección de los plásmidos las suplementamos con antibióticos. Los antibióticos que usamos fueron cloranfenicol (Cm) a 40 µg/ml, ampicilina (Ap) a 100 µg/ml, espectinomicina (Sp) a 50 µg/ml o kanamicina (Km) a 50 µg/ml. Para la inducción de las distintas cepas transformadas con alguno de los plásmidos descritos previamente, inoculamos colonias individuales desde las placas a LB líquido, con 2% (p/v) de glucosa y antibióticos. Incubamos a 30 °C sin agitación durante una noche. A la mañana siguiente diluimos el cultivo a DO<sub>600</sub> 0,4 en LB sin glucosa y con el antibiótico correspondiente e incubamos a 30 °C con agitación (170 rpm) en un agitador orbital. Cuando el cultivo alcanza una DO<sub>600</sub> 0,5 añadimos al mismo isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 50 µM. La inducción durante 2 horas a 170 rpm a 30 °C.

En los cultivos de mutantes condicionales en *E. coli* UT5600 (UTP<sub>BAD</sub>::bamA, UTdegP-P<sub>BAD</sub>::bamA, UTdegP-P<sub>BAD</sub>::surA) partimos de un inóculo en LB + 0,4% (p/v) L-(+)-arabinosa a 30 °C con agitación (170 rpm en un agitador orbital) durante toda la noche. A la mañana siguiente diluimos a DO<sub>600</sub> 0,05 en LB con 0,4% (p/v) de glucosa (medio represor) y 50 µM de IPTG. Inducimos a 37 °C durante 2 h a 170 rpm. Cuando el cultivo alcanza una DO<sub>600</sub> 0,5 lo diluimos a DO<sub>600</sub> 0,05 en el medio represor. Este proceso lo repetimos 3-4 veces mientras

el cultivo crezca, para que la proteína mutada (SurA o BamA) deje de producirse y la que quede en la célula sea degradada. Las diluciones se hacen con el objetivo de que el cultivo se mantenga en fase exponencial.

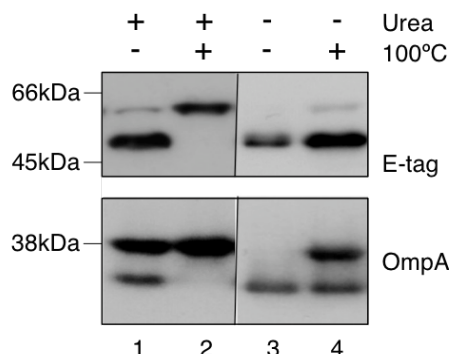
El cultivo de la cepa de *E. coli* 2348/69 enteropatógeno (EPEC) lo realizamos en un laboratorio de nivel de seguridad P2. Inoculamos las bacterias desde placa a LB líquido sin suplementar, e incubamos a 37 °C con agitación (170 rpm) en un agitador orbital (~16 h).

#### **4. Electroforesis de proteínas y *Western blots*.**

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) la realizamos según métodos estándar (Ausubel *et al.*, 1997). Para la preparación de los extractos de proteína total de los cultivos, centrifugamos (3300 g, 3 min) 1 ml de los cultivos a  $DO_{600} \sim 1,5$ . En los ensayos con los mutantes condicionales de BamA y SurA centrifugamos 2 ml de cultivo a  $DO_{600} \sim 0,5$ . Las células obtenidas las resuspendemos en 100  $\mu$ l de Tris-HCl 100 mM pH 8. Añadimos a las muestras 100  $\mu$ l de tampón de carga de proteínas 2x (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol (2-ME), 10% (v/v) glicerol y 0,01% (p/v) azul de bromofenol) tras lo cual hervimos o no (según se indique), a 100 °C durante 10 min. Posteriormente aplicamos un pulso de sonicación (10 seg a potencia máxima en un sonicador LABSONIC U, B. Braun) y centrifugamos (16.000 g, 3 min) para eliminar la viscosidad del peptidoglicano y del DNA, así como cualquier material insoluble. Recogemos el sobrenadante y cargamos 8-10  $\mu$ l de cada una de las muestras en geles al 10% de poliacrilamida en un sistema de electroforesis Miniprotean III (Bio-Rad).

En los ensayos realizados con plásmidos que expresen proteínas derivadas de Intimina el tampón de carga 2x contiene adicionalmente 2% SDS, 8 M urea y 10 mM ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Estas muestras las hervimos durante 30 min y empleamos geles de poliacrilamida al 8%. Es necesario este protocolo para poder observar el cambio de movilidad de las construcciones derivadas de

Intimina, ya que es muy resistente a la desnaturalización (carriles 2 y 4, Figura 13).



**Figura 13.** Control de desnaturalización de Intimina.

Panel superior, *Western blot* con anti-E-tag mAb para detectar Intimina. En el panel inferior, *Western blot* con anti-OmpA que empleamos como control interno. La presencia de urea en el tampón de carga hace que parcialmente se desnaturalice Intimina y OmpA (carril 1).

Para los ensayos de *Western blot*, transferimos los geles a membranas de polivinildeno difluorado (PVDF; Immobilon-P, Millipore) en semi-seco (Bio-Rad). Para detectar las construcciones derivadas de los dominios transportadores de los ATs e Intimina utilizamos anti-E-tag-POD mAb (1:5000; GE Bioescience) o anti-C-myc-POD mAb (1:5000; Roche). GroEL y OmpA los detectamos con anticuerpos anti-GroEL-POD mAb (1:5000; Sigma) y un policlonal de conejo anti-OmpA (1:10.000; cedido por el Dr. H. Nikaido). Para poder detectar Intimina completa expresada por EPEC, empleamos un anticuerpo policlonal de conejo anti-Int280 (1:200; cedido por Dr. G. Frankel). TolC, Skp, DegP, SurA y BamA los detectamos con sueros policlonales de conejo específicos contra TolC (1:2000; cedido por Dr. V. Koronakis), contra Skp (1:1000; cedido por Dr. M. Muller), contra MBP-DegP (1:5000; cedido por Dr. M. Ehrmann), contra SurA (1:10000; cedido por Dr. R. Kolter) y contra BamA (1:5000; cedido por Dr. T. Silhavy). Como anticuerpo secundario de los policlonales de conejo usamos proteína A-POD (1:5000; Zymed). Utilizamos un anticuerpo primario de ratón anti-MBP mAb (1:4000; Sigma) y un anticuerpo secundario anti-ratón-POD mAb (1:5000; Sigma) para reconocer la proteína MBP (proteína de unión a maltosa), que empleamos como control de las fracciones de periplasma del fraccionamiento subcelular.

Para detectar el patrón de pesos moleculares (Bio-Rad) que marcamos con biotina (Sigma), usamos estreptavidina-POD (Roche). La actividad de la peroxidasa la detectamos usando una mezcla quimioluminiscente que contiene 1,25 mM luminol (Sigma), 0,2 mM ácido cumárico (Sigma) y 0,0075% (v/v)  $H_2O_2$  en 100 mM Tris-HCl pH 8,5. Para conseguir mayor sensibilidad se utilizamos un *kit* de quimioluminiscencia (Roche). Las membranas las expusimos a una película de rayos X (medical film; Konica Minolta) o un aparato “ChemiDoc” (Bio-Rad).

### **5. Ensayo de accesibilidad a proteasas.**

Los cultivos de bacterias que expresan los híbridos del dominio transportador de los ATs o Intimina una vez inducidos los recogimos por centrifugación (3300 g, 3 min), lavamos y resuspendemos en Tris-HCl 10 mM pH 8. Un ml de cultivo a  $DO_{600} \sim 1,5$  lo resuspendemos en 100  $\mu$ l. A este volumen adicionamos 10  $\mu$ g/ml de tripsina (Sigma) en el caso de los ATs y 40  $\mu$ g/ml de proteinasa K (Roche) para Intimina, concentraciones finales. Incubamos 20 min a 37 °C, tras lo cual añadimos 1  $\mu$ l inhibidor de tripsina (Sigma) o 1  $\mu$ l de inhibidor de serín proteasas (fenilmetilsulfonyl fluorado, PMSF 100mM; Gibco) respectivamente, para parar la reacción. Los extractos los lavamos con Tris-HCl 10 mM pH 8 y resuspendimos en el volumen inicial, en el mismo tampón. Añadimos 100  $\mu$ l de tampón de carga de proteínas 2x (descrito previamente) para los ATs y con urea para Intimina. Incubamos a 100 °C 10 min para los ATs y 30 min Intimina.

### **6. Análisis de citometría de flujo.**

De un cultivo inducido con las correspondientes construcciones tomamos 2 ml a  $DO_{600} \sim 1$  y lavamos 2 veces con 2 ml de PBS filtrado. Resuspendemos en 2 ml de PBS suplementado con 5% de suero de cabra (tampón PC) e incubamos 15 min a temperatura ambiente. Tomamos 1 ml y añadimos anti-E-tag mAb sin conjugar (1:100; GE Bioescience). Incubamos 50 min a temperatura ambiente en una noria giratoria. Lavamos 3 veces con 1 ml de PBS filtrado. Resuspendemos en 500  $\mu$ l de tampón PC con anti-ratón conjugado con Alexa-488 a una dilución 1:500. Incubamos 50 min en oscuridad. Lavamos 2 veces con 1 ml de PBS filtrado. Finalmente, resuspendemos en 1 ml de PBS y llevamos al citómetro para realizar las medidas. Usamos un citómetro (COULTER EPICS XL-MCL, Beckman

Coulter) equipado con un láser de argón y utilizando una longitud de onda de excitación a 488 nm.

Las centrifugaciones las realizamos a 3300 g durante 3 min a temperatura ambiente y usamos siempre tubos eppendorf de 2 ml. El PBS empleado en todos los protocolos de este trabajo es: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Para los ensayos de citometría de flujo con antígeno marcado con fluoresceína (FITC, fluoresceína-5-isotiocianato), una vez lavado el cultivo lo resuspendemos en 400 µl de PBS y dividimos en dos fracciones de 200 µl. A una le adicionamos fibrinógeno-FITC (concentración final 20 nM) y a la otra BSA-FITC (concentración final 100 nM). Incubamos 60 min a temperatura ambiente, agitando de vez en cuando suavemente. Lavamos tres veces con 1 ml de PBS filtrado y resuspendemos finalmente en 1 ml de PBS y llevamos al citómetro.

### **7. Inmunoensayos ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*).**

Llevamos a cabo dos tipos de ELISAs en este trabajo. Uno empleando las células como antígeno para recubrir las placas de ELISA (Maxisorp; Nunc) y analizar así el nivel de exposición de los pasajeros en la superficie de *E. coli* o la accesibilidad al PG. Un segundo tipo en el que las bacterias se emplean como anticuerpo primario en placas previamente recubiertas con el antígeno correspondiente, ambos descritos en (Veiga et al., 1999). Las células en todos los casos están intactas y no han sido permeabilizadas. Después de inducir el cultivo, lo resuspendemos en PBS a una DO<sub>600</sub>~3. Empleamos como antígeno positivo fibrinógeno humano (25 µg/ml) y como antígeno control la seroalbúmina bovina (BSA; 50 µg/ml; New England Biolabs). La unión del antígeno a la placa la realizamos sin agitación a 4 °C, toda la noche. La unión de las bacterias a la placa durante 1 h a temperatura ambiente. La proteína o las células no unidas las desechamos y bloqueamos los pocillos con PBS y 3% (p/v) de leche desnatada. Tras 2 h, desechamos la solución de bloqueo y añadimos el anticuerpo primario

correspondiente. El resto de incubaciones son de 1 h y tras cada una de ellas se realizamos tres lavados con PBS.

Incubamos las muestras con anti-E-tag-POD mAb (1:2000; GE Bioescience) para conocer el nivel de exposición de los pasajeros y la unión de los VHH expresados por la bacterias a su antígeno. Para el nivel de accesibilidad del PG, empleamos suero de conejo anti-PG de *E. coli* (1:1000; cedido por el Dr. M. A. de Pedro) y proteína A-POD (1:3000; Zymed).

Para el revelado del ensayo empleamos 80 µl/pocillo de una mezcla de o-fenilendiamina (OPD; 0,4 mg/ml; Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,012%; Sigma) en tampón fosfato-citrato (103 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 24 mM ácido cítrico pH 5). La reacción se desarrolla en oscuridad 10 min, la paramos con 20 µl/pocillo de HCl 3N y medimos la absorbancia a 490 nm (lector Benchmark *microplate reader*; Bio-Rad).

## 8. Ensayo de sensibilidad a antibióticos.

Una vez inducidos los cultivos de *E. coli*, plaqueamos en placas con 50 µM de IPTG para mantener la expresión de las proteínas y colocamos discos Whatman con los antibióticos en las placas. Incubamos a 30 °C durante 24 h y medimos el halo de inhibición que aparece alrededor de los discos de antibióticos. Medida en mm desde el borde del disco al borde del halo.

## 9. Entrecruzamiento (*cross-linking*) de proteínas *in vivo*.

Se siguió el protocolo descrito por (Thanabalu *et al.*, 1998). Tras la inducción del cultivo de *E. coli* transformado con los distintos plásmidos, recogimos las células. Las resuspendemos en un décimo del volumen de inducción en PBS con 2,5 mM ditiolbis(succinimidil propionato) (DSP, Pierce) e incubamos 30 min a temperatura ambiente (~23 °C) para el entrecruzamiento. Paramos la reacción con 50 mM Tris-Cl pH 7,5. Tras 15 min, lavamos dos veces las células con 10 mM Tris-Cl pH 7,5 y finalmente resuspendemos en el mismo tampón. Añadimos un volumen de tampón para SDS-PAGE (2x) con o sin 5% (v/v) 2-ME. La

presencia del agente reductor 2-ME permite la ruptura del puente disulfuro entre el agente entrecruzante y las proteínas.

### 10. Purificación de los dominios autotransportadores e Intimina.

La purificación de las construcciones derivadas de los dominios transportadores de los ATs y la Intimina la realizamos de un modo análogo al ya descrito para la purificación de pHE $\beta$  en (Veiga et al., 2002).

Las células de *E. coli* UT5600 transformadas con las distintas construcciones las crecimos en 200 ml de LB suplementado con Cm y 2% glucosa, durante toda la noche a 30 °C en un agitador orbital (250 rpm). A la mañana siguiente, diluimos el cultivo a DO<sub>600</sub>~0,2 en 2 L de medio 2xYT con Cm. Crecemos el cultivo durante 1 h a 30 °C con agitación. A continuación, adicionamos IPTG a una concentración final de 100  $\mu$ M. Indujimos el cultivo durante 4 horas. Para Intimina completa de EPEC 2348/69 el cultivo no se induce, porque expresa la proteína constitutivamente, por tanto el cultivo se deja toda la noche crecer sin agitación a 37 °C.

Una vez inducidos los cultivos centrifugamos (1500 g, 10 min) y congelamos el *pellet* a -80 °C. Chequeamos la expresión del cultivo antes de continuar con la purificación. Resuspendimos el *pellet* en 100 ml de tampón TN (20 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM NaCl) suplementado con 0,1 mg/ml DNasa I (Roche), 0,1 mg/ml RNasa A pancreática (Amresco), 0,1 mM PMSF y un combinado de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free; Roche). Mantenemos siempre la muestra a 4 °C. Para lisar el cultivo utilizamos una prensa de French (1000 p.s.i.). Centrifugamos el cultivo (1500 g, 10 min, 4 °C) para quitar la fracción de células no lisadas. A continuación ultracentrifugamos (100.000 g, 1 h, 4 °C, Beckman), el precipitado corresponde a las membranas totales. Para eliminar la fracción de proteínas de MI, resuspendimos el precipitado en 20 ml de tampón TN con 1,5% (v/v) Triton X-100 (Sigma) (Schnaitman, 1971). Volvimos a ultracentrifugar y en este caso el precipitado es la ME y restos insolubles, mientras que en la fracción soluble quedan las proteínas de MI. Resuspendimos el precipitado en 10 ml de



tampón TN con 1% (p/v) Zwittergent 3-14 (Calbiochem) e incubamos en una noria giratoria 1 h a 4 °C. Ultracentrifugamos de nuevo, de modo que en el precipitado quedan los restos de membrana insolubles y en el sobrenadante las proteínas de ME.

Equilibramos en tampón TNZ (tampón TN, 0,2% (p/v) Zwittergent 3-14) una alícuota de 10 ml de resina de agarosa que contiene cobalto (50% (v/v) Talon; Clontech) y adicionamos el extracto de proteínas de ME. Incubamos en una noria giratoria durante toda la noche a 4 °C para maximizar la unión a la resina. Empaquetamos en una columna de cromatografía (Econopac; Bio-Rad) que contenía 3 ml adicionales de resina equilibrada en TNZ. Pasamos tres veces dicho extracto por la columna para favorecer la unión de las proteínas a la resina. Lavamos con 20 ml de TNZ con 5 mM de imidazol (Sigma). Y eluimos con 12 ml de TNZ con 120 mM de imidazol, tomamos alícuotas de 1 ml.

#### **11. Geles nativos y *blue native*-PAGE (BN-PAGE).**

Para poder conocer el tamaño en condiciones nativas de las proteínas de ME purificadas hicimos geles nativos (sin SDS) y llevamos a cabo una electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) basándonos en el protocolo de (Schägger *et al.*, 1994). Preparamos geles nativos de poliacrilamida 4%-15% con un formador de gradientes (Hoefer SG15) y un sistema Miniprotean III (Bio-Rad). A los extractos de ME en el caso de Intimina y a las alícuotas más concentradas de la purificación de las construcciones derivadas de los ATs les adicionamos glicerol (Merck) y azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) a una concentración final de 8,7% (v/v) y 0,5% (p/v) respectivamente. Cargamos 12 µl de cada muestra, con o sin hervir. El tampón del cátodo es 50 mM tricina (Fluka), 15 mM BisTris/HCl pH 7 (Fluka) y 0,002% de azul de Coomassie G250 (Bio-Rad). El tampón del ánodo es 50 mM BisTris/HCl pH 7. Empleamos marcadores de peso molecular nativos (66-669 kDa; GE Bioscience). Resuspendimos los marcadores a una concentración final de 2,5 mg/ml en 50 mM Bis-Tris HCl pH 7 y 750 mM ácido aminocaproico, cargamos en el gel 5 µl. Corrimos el gel 45 min a 100 V y después de este tiempo, una vez que han penetrado correctamente en el gel las muestras, subimos el voltaje a 500 v y dejamos correr el gel hasta que el frente

esté al borde del cristal. El frente corresponde a un tamaño inferior a 30 kDa. Después, desteñimos el gel con agua destilada en caso de que queramos ver el gel teñido con azul de Coomassie y para un *Western blot* lo transferimos directamente a una membrana de PVDF según protocolo convencional. El azul de Coomassie da carga negativa a las proteínas para que puedan transferirse a la membrana.

### 12. Microscopía de inmunofluorescencia.

Después de inducir el cultivo, centrifugamos, lavamos con PBS y lo resuspendemos a  $DO_{600} \sim 0,5$ . Previamente adicionamos 10  $\mu$ l de poli-L-lisina (1mg/ml) a un cubreobjetos ( $\varnothing$  13 mm, VWR) y dejamos secar. A continuación, añadimos 10  $\mu$ l de la solución de células e incubamos 30 min. Lavamos con PBS para retirar las células no pegadas y adicionamos formaldehído 3,65% hasta cubrirlo, incubamos 20 min. Lavamos 3 veces con PBS. Bloqueamos con 50  $\mu$ l de suero de cabra al 10% en PBS (tampón A) e incubamos 1 h. Añadimos 20  $\mu$ l de tampón A con anti-E-tag mAb (1:1000, GE Bioescience) o anti-myc-tag mAb (1:1000, Cell Signaling) e incubamos 1 h. Lavamos 3 veces con PBS. Añadimos 20  $\mu$ l de tampón A con anti-ratón (1:500) conjugado con Alexa-594 e incubamos 1 h. Lavamos 3 veces con PBS. Añadimos 4  $\mu$ l de medio de montaje (Vectashield; Vector) y sellamos el cubreobjetos a un portaobjetos con esmalte. También usamos diamino-fenil-indol (DAPI) a 63 ng/ml para detectar el DNA de las bacterias. Todas las incubaciones a temperatura ambiente.

### 13. Ensayos de agregación bacteriana.

Empleamos un protocolo similar al descrito en (Veiga et al., 2003a). Realizamos la inducción de los cultivos siguiendo el protocolo general y ajustamos la  $DO_{600} \sim 1,25$  entre todos los cultivos para comparar el tiempo que tardan en sedimentar. La inducción de los cultivos la hacemos individualmente y luego para favorecer la agregación y reducir la inespecificidad mezclamos cada uno de los cultivos con *E. coli* UT5600/pFos $\beta$  (aportando cada una de las poblaciones el mismo número de células). Para la cinética de agregación tomamos muestras a 1 cm de la superficie y medimos la  $DO_{600}$  a distintos tiempos.

El ensayo de agregación para el rastreo de mutantes de la librería de *E. coli* UT5600 miniTn10::Km los realizamos en placas multipocillo. Después de inducir los cultivos durante 4 h a 30 °C con agitación, añadimos *E. coli* UT5600/pFos $\beta$  y continuamos la inducción a 30 °C sin agitación. A las 24 h analizamos el fenotipo en función del aspecto del precipitado que aparece en el fondo del pocillo (ver Figura 43).

#### 14. Fraccionamiento celular y sensibilidad a SDS.

Partiendo de un cultivo inducido (100 ml) según el protocolo general, lo centrifugamos (3300 g, 10 min) y congelamos el *pellet* de células. Resuspendemos el *pellet* en 20 ml de tampón de sonicación (TS: 10 mM Tris-HCl pH 8 con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free; Roche)). Sonicamos con la potencia máxima mediante pulsos de 30 seg y descansos de 30 seg, hacemos 8 ciclos, la muestra siempre en hielo. Centrifugamos (3300 g, 10 min, 4 °C) 16 ml para retirar el material insoluble. Ultracentrifugamos (100.000 g, 1 h a 4 °C) el extracto celular. El sobrenadante es la fracción soluble (**S1**) y el precipitado lo resuspendemos en 16 ml de TS, lo dividimos en 4 fracciones y volvemos a ultracentrifugar. El sobrenadante lo desechamos, el precipitado de tres alícuotas lo resuspendemos en 2 ml de TS con 1,5% (v/v) Triton X-100 (Sigma) e incubamos en hielo 30 min. La cuarta alícuota la resuspendemos en 0,66 ml de TS (**P1** o fracción de membrana total). Volvemos a ultracentrifugar (las tres alícuotas), siendo el sobrenadante (**S2**) la fracción de proteínas de MI extraída con Triton X-100 (Schnaitman, 1971), y el precipitado (**P2**, proteínas de ME totales y restos de membranas) lo resuspendemos en 2 ml de TS con 4 M urea e incubamos en hielo 30 min. Ultracentrifugamos la muestra, de modo que el sobrenadante (**S3**) son las proteínas asociadas a la ME y el precipitado que resuspendemos en 2 ml de TS corresponde a las proteínas integradas en la ME (**P3**), dichas proteínas resisten la extracción con urea.

La sensibilidad a SDS de las construcciones con y sin la hélice  $\alpha$ , así como los intercambios, las realizamos con la fracción P2. Dicho precipitado lo

resuspendemos en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 con concentraciones crecientes de SDS (0-2%). Adicionamos tampón de carga de proteínas 2x sin SDS y cargamos las muestras en un gel de electroforesis SDS-PAGE normal. El gel lleva 0,1% SDS.

### **15. Transducción con un lisado de P1.**

Empleamos el protocolo descrito en (Miller, 1992) para realizar la preparación del lisado del fago P1, su titulación y la transducción con dicho lisado. Gracias a ello podemos trasladar una mutación de un fondo genético a otro.

### **16. Caracterización del punto de inserción del minitransposón mTn10::km.**

Llevamos a cabo la extracción de DNA genómico de los mutantes de Tipo 2 a caracterizar y realizamos dos PCRs empleando oligos degenerados y contra la secuencia conocida del gen  $Km^r$  (Caetano-Anolles, 1993). En una primera PCR empleando como molde el DNA genómico con los oligos ARB1 (oligo degenerado) y mTn10-1. A continuación una segunda PCR utilizando como molde el producto de la PCR anterior y los oligos ARB2 y mTn10-2, que hibridan con la secuencia de los oligos anteriores. Para caracterizar la región opuesta del minitransposón empleamos los oligos mTn10-3 y mTn10-4.

### **17. Análisis mediante MACS (*Magnetic cell sorting*).**

Después de la inducción del cultivo, lavamos  $2 \times 10^9$  células 3 veces con 2 ml de PBS filtrado. En un volumen final de 200  $\mu$ l de PBS con 0,5% BSA (tampón A) añadimos  $2 \times 10^8$  células y el antígeno a una concentración final de 100 nM o anti-E-tag-biotina a una dilución 1:100. Incubamos 1 h a temperatura ambiente. Añadimos 1 ml de tampón A y centrifugamos. Lavamos 4 veces el precipitado con 1 ml de tampón A. Resuspendemos en 80  $\mu$ l de tampón A y añadimos 20  $\mu$ l de anti-biotina-microbolitas. Incubamos 20 min a 4 °C. Añadimos 1 ml de tampón A y centrifugamos. Lavamos 4 veces el precipitado con 1 ml de tampón A. Resuspendemos en 500  $\mu$ l de tampón A. Tomamos 10  $\mu$ l para plaquear y poder saber el número de células después del tratamiento. Añadimos los 490  $\mu$ l restantes a una columna de separación de MACS (25 MS columnas; Miltenyi Biotec) previamente equilibrada en el tampón A. Las células pasan por gravedad

por la columna, y una vez que éstas han pasado, lavamos la columna 3 veces con 500 µl de tampón A. Esta fracción corresponde a las células no unidas. Eluimos las células unidas a la columna con 2 ml de LB aplicando un émbolo a la columna y retirando ésta del imán. Plaqueamos las tres fracciones: células antes de pasar por la columna, no unidas y unidas, y calculamos el número de células en cada una de ellas. Las centrifugaciones las realizamos a 3300 g durante 3 min a temperatura ambiente, en eppendorfs de 2 ml. No usamos nunca vortex.



## **RESULTADOS**

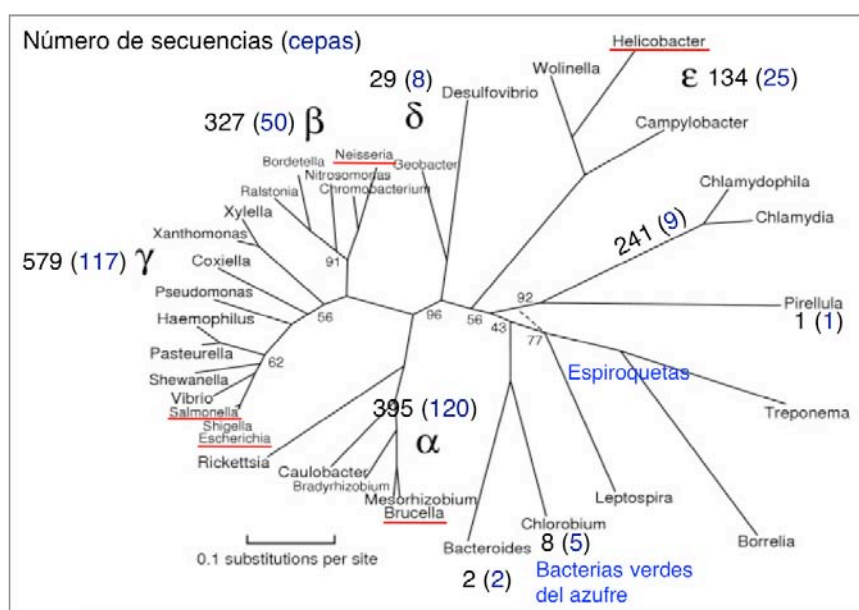




## 1. Caracterización del dominio de autotransporte y su relación estructura-función.

### 1.1. Selección de los autotransportadores y su caracterización *in silico*.

Con el objetivo de realizar un estudio comparativo de varios autotransportadores (ATs) clásicos o sistema de secreción tipo Va (Henderson et al., 2004) y caracterizar la región mínima con capacidad de autotransporte en cada uno de ellos, hemos seleccionado ATs con relevancia en patogénesis y representativos de las principales proteobacterias. Las proteobacterias que engloban las bacterias clasificadas tradicionalmente como Gram negativas, se dividen en 5 grupos en función de las secuencias de rRNA y se denominan con las letras griegas de  $\alpha$  a  $\epsilon$  (Figura 14).



**Figura 14.** Árbol filogenético de las proteobacteria.

Aparecen subrayadas en rojo el género de bacterias que hemos seleccionado para este trabajo. Figura adaptada de (Bern y Goldberg, 2005). El número de secuencias y las cepas en las que se encuentran se ha obtenido de Pfam familia PF03797.

Seleccionamos al menos un AT de cada clase de proteobacterias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\gamma$ ), excepto de las  $\delta$ -proteobacterias, al no tratarse de patógenos humanos. Para la expresión de los ATs elegimos *E. coli* K-12, una  $\gamma$ -proteobacteria, por tratarse de un modelo empleado frecuentemente en el estudio de ATs. Los ATs escogidos se describen a continuación y se resumen en la Tabla 5.

## Resultados

- **EhaA**: AT de *E. coli* O157:H7 EDL933, cepa enterohemorrágica (EHEC),  $\gamma$ -proteobacteria. Dicho AT está implicado en adhesión y formación de *biofilms* en el tracto gastrointestinal (Wells *et al.*, 2008).
- **ShdA**: AT de *S. enterica* serovar *typhimurium* LT2,  $\gamma$ -proteobacteria. Media la adhesión a fibronectina en las infecciones de *Salmonella* (Kingsley *et al.*, 2004). La elección de un segundo AT de una  $\gamma$ -proteobacteria, fue realizada para disponer de un AT que no fuera de *E. coli*, que empleamos como organismo modelo.
- **IgAP**: AT de *N. gonorrhoeae* MS11,  $\beta$ -proteobacteria. Es una proteasa encargada de degradar la IgA1 en las infecciones de *Neisseria* (Kilian *et al.*, 1980). Fue el primer AT descrito (Pohlner *et al.*, 1987) y ha sido el modelo de estudio previo en el laboratorio (Veiga *et al.*, 2002).
- **NalP**: AT de *N. meningitidis* MC58,  $\beta$ -proteobacteria. Es una serín proteasa que además de su actividad autoproteolítica está implicada en el procesamiento de otros ATs como IgAP y App (van Ulsen *et al.*, 2003). Fue el primer cristal obtenido de un dominio transportador de un AT clásico (Oomen *et al.*, 2004).
- **BruA**: AT de *B. abortus* 2308,  $\alpha$ -proteobacteria. No tiene función conocida y es el único AT predicho mediante análisis del genoma. El bajo número de ATs en las  $\alpha$ -proteobacterias es una característica común, la ratio entre número de secuencias y cepas en las que aparecen es el menor de los grupos de proteobacterias (Figura 14). Además, *Brucella* es un parásito intracelular que consigue sobrevivir pasando desapercibido al sistema inmune. No posee sistemas de secreción tipo I, II, ni III, tampoco citolisinas o exoproteínas, posee un sistema de secreción tipo IV (Boschiroli *et al.*, 2002; Gorvel y Moreno, 2002).
- **VacA**: AT de *H. pylori* 60190,  $\epsilon$ -proteobacterias. Por su actividad citotóxica desarrolla un papel muy relevante en la aparición de úlceras y cáncer en el

estómago en las infecciones crónicas de *H. pylori* (Fischer *et al.*, 2001; Wen y Moss, 2008).

**Tabla 5.** Autotransportadores seleccionados.

	Organismo	Clase	Nº ATs	Nombre	GenBank	Tamaño (aa)	Función	Transportador Nombre Tamaño (aa)	
ATs	<i>E. coli</i> O157:H7 EDL933	$\gamma$	15	EhaA	Q7AH89	1327	adhesina	HEA	339
	<i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium LT2	$\gamma$	7	ShdA	AAL21407	2039	adhesina	HES	320
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> MS11	$\beta$	2	IgAP	CAA28538	1532	proteasa	HEI	307
	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	$\beta$	5	NalP	AAN71715	1083	proteasa	HEN	308
	<i>Brucella abortus</i> 2308	$\alpha$	1	BruA	Q576H6	3422	desconocida	HEBA	338
	<i>Helicobacter pylori</i> 60190	$\varepsilon$	4	VacA	AAA17657	1287	citotoxina	HEV	373

Nota: se indica el número de ATs de cada una de las cepas obtenido de Pfam familia PF03797. Nombramos las construcciones HE más la inicial del AT empleado. H por el epítipo 6xHis y E por el epítipo E-tag.

Este estudio se centra en el análisis del dominio de autotransporte, por ello descartamos el dominio pasajero nativo de cada uno de los ATs seleccionados (ver Figura 5). El cristal descrito para el dominio de autotransporte de NalP (Oomen *et al.*, 2004), consiste en una hélice  $\alpha$  y 12 hojas  $\beta$  anfipáticas transmembrana que forman un barril  $\beta$  con la hélice  $\alpha$  dentro del poro del barril. Hicimos una predicción de estructura secundaria de las proteínas seleccionadas empleando distintos servidores web para poder comparar con el cristal. Para la predicción de hélices  $\alpha$  utilizamos PSI-pred (Jones, 1999) y para la predicción de las hojas  $\beta$  anfipáticas Pred-TMBB (Bagos *et al.*, 2004) y ProfTMB (Bigelow *et al.*, 2004), quedándonos con el consenso entre las dos predicciones (Figura 15). Pese a la baja homología en estructura primaria entre los ATs, en todas las predicciones de estructura secundaria aparece una hélice  $\alpha$  en el extremo N-terminal y 12 hojas  $\beta$  transmembrana. Esta homogeneidad indica la posible formación de un barril  $\beta$  con la presencia de una hélice  $\alpha$  conservada en todos ellos, equivalente al cristal de NalP.

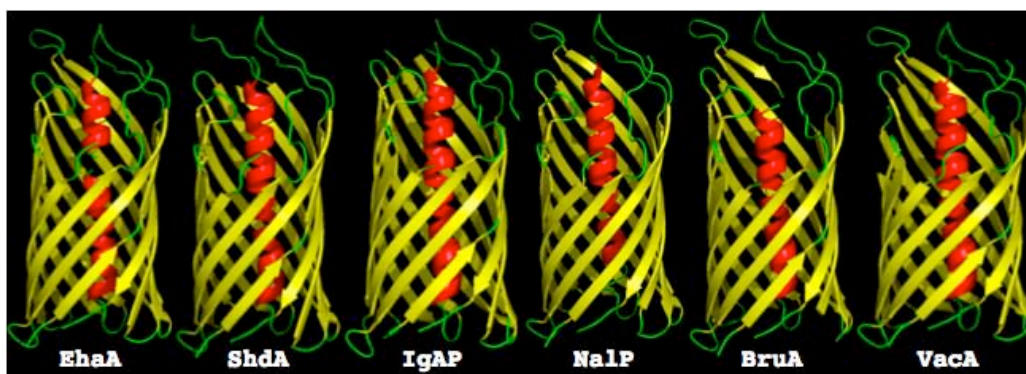
## Resultados

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Figura 15.** Predicción de estructura secundaria de los dominios transportadores seleccionados.

En verde aparece la predicción de la hélice  $\alpha$  y en rojo las hojas  $\beta$  transmembrana anfipáticas. Abreviaturas: LI – *loop* interno y LE – *loop* externo. El apilamiento se hizo con el servidor web tcoffee (Larkin *et al.*, 2007) que nos da una homología de secuencia: (\*) 100% identidad, (:) >60% de similitud y (.) >40% de similitud. En negrita aparecen los aminoácidos conservados en los apilamientos que aparecen en el servidor web Pfam de la familia de los ATs PF03797 (Finn *et al.*, 2008).

A continuación realizamos una predicción de estructura terciaria empleando el servidor web Genesilico Metaserver-meta2 (Kurowski y Bujnicki, 2003) (Figura 16). El servidor emplea como “molde” la estructura 3D conocida de una proteína y encaja en él la predicción de estructura secundaria de la proteína a estudio.



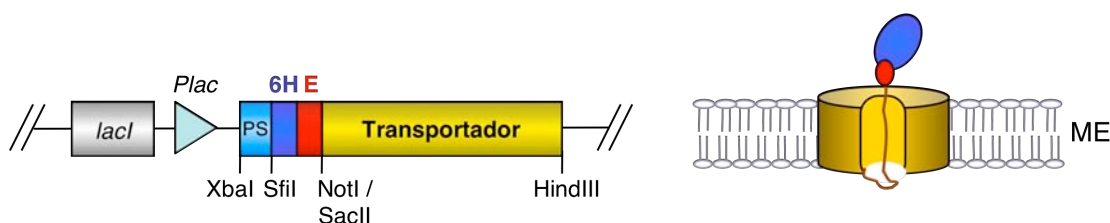
**Figura 16.** Predicción de estructura 3D de los dominios transportadores.

Se empleó el servidor web Genesilico Metaserver (Kurowski y Bujnicki, 2003). Todas son predicciones excepto NalP que es un cristal (Oomen *et al.*, 2004).

En todas las predicciones aparece la hélice  $\alpha$  dentro del poro del barril  $\beta$ , al igual que en el cristal de NalP (Oomen et al., 2004). Comparando las estructuras, las diferencias entre las predicciones y el cristal de NalP no son relevantes.

## 1.2. Plegamiento y capacidad de autotransporte.

Estudiamos el plegamiento y la capacidad real de transporte en *E. coli* K12 de todos los dominios seleccionados. Para ello clonamos dichos dominios en base a la predicción de estructura secundaria (región transmembrana de 12 hojas  $\beta$  y una hélice  $\alpha$  en el extremo amino terminal). Las secuencias seleccionadas son exactamente las que aparecen en la Figura 15. Estos dominios se clonaron en el vector pHE $\beta$ , reemplazando la región C-terminal de la IgAP de 45 kDa (C-IgAP) presente en él. Así, todas las proteínas híbridas empleadas en este trabajo siguen el mismo diseño (Figura 17). Empezando desde el N-terminal, contienen el péptido señal de PelB (PS) (Keen y Tamaki, 1986), que las dirige hacia el sistema Sec para su translocación a través de la membrana interna (MI); un pequeño dominio pasajero formado por los péptidos 6xHis (6H) y el epítipo E-tag; por último el dominio transportador seleccionado, que colabora en la translocación del dominio pasajero a través de la membrana externa (ME). La expresión de estas proteínas de fusión en los vectores generados está controlada por el promotor del operón *lac* de *E. coli* (*Plac*) que se induce añadiendo IPTG al medio de cultivo mientras que la glucosa permite su represión.



**Figura 17.** Estructura modular de las proteínas híbridas de los dominios transportadores.

Estructura de las proteínas híbridas con los dominios transportadores seleccionados (izquierda) y esquema de cómo quedaría insertada en la ME la proteína (derecha). En azul claro aparece el péptido señal (PS), en azul oscuro el péptido de 6xHis (6H), en rojo el epítipo E (E) y en amarillo el dominio transportador (Figura 15). El dominio pasajero está flanqueado por sitios de corte de enzimas de restricción (*SfiI* y *NotI*), así como el dominio transportador (*SacII* y *HindIII*), lo que permite el reemplazamiento de los distintos módulos.

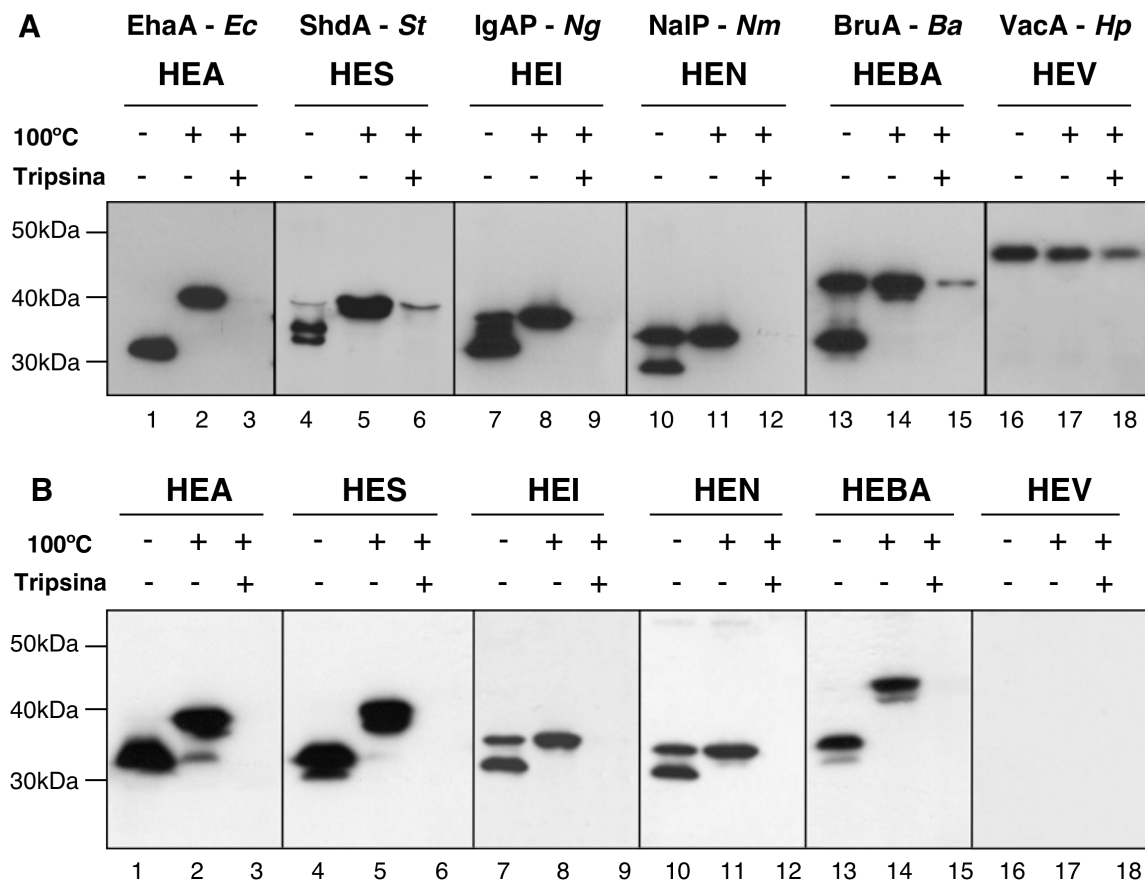
Las proteínas de ME que forman barriles  $\beta$ , presentan un cambio de movilidad en geles SDS-PAGE característico en función de hervir o no la muestra (Koebnik *et al.*, 2000). Los barriles  $\beta$  de las proteínas de ME son frecuentemente resistentes al SDS (a bajas temperaturas) y su conformación nativa es más compacta que la forma desnaturalizada. Al hervir las proteínas a 100 °C en presencia de SDS, éstas se desnaturalizan completamente y migran con la movilidad correspondiente a su masa, mientras que en la muestra sin hervir la migración en el gel es más rápida a la esperada. Este cambio de movilidad en función de hervir o no la muestra nos dice si la proteína de estudio está plegada formando un barril  $\beta$  estable y, por lo tanto, insertada en la ME.

Expresamos las construcciones con los dominios transportadores seleccionados (HEA, HES, HEI, HEN, HEBA y HEV) en la cepa *E. coli* UT5600, que es una cepa mutante en la proteasa de ME OmpT (Grodberg y Dunn, 1988). Esta cepa se había utilizado en el laboratorio previamente para la expresión de construcciones con la región C-IgAP (Veiga *et al.*, 1999; Veiga *et al.*, 2002). La adición de proteasas exógenamente a células intactas nos permite degradar los pasajeros expuestos en la superficie de la célula y que por tanto, han sido translocados por el dominio transportador. En estas construcciones los dominios que deben ser accesibles a la proteasa (en caso de ser translocados) son los epítomos 6xHis y E-tag. Empleamos tripsina como proteasa para estos ensayos y la desaparición de la banda correspondiente a la proteína de fusión en el *Western blot* indica la degradación de los dominios pasajeros, mientras el dominio transportador permanece insertado en la ME.

Podemos ver que las proteínas derivadas de los ATs EhaA (HEA) y ShdA (HES), están plegadas prácticamente en su totalidad (Figura 18A), ya que observamos un cambio de movilidad completo (carriles 1-2 y 4-5, respectivamente). Para las construcciones derivadas de IgAP (HEI), NaIP (HEN) y BruA (HEBA), una parte de la proteína expresada aparece en el tamaño de la conformación desplegada en muestras no hervidas (banda superior; carriles 7, 10 y 13). Ésto podría indicar un defecto en el plegamiento o una mayor sensibilidad a SDS de la proteína. El



hecho de que el pasajero de estas construcciones sea mayoritariamente degradado por la adición de tripsina (carriles 9, 12 y 15) apoya el correcto plegamiento de la mayoría de la proteína correspondiente a HEN, HEI y, en menor medida, a HEBA.



**Figura 18.** Expresión de las proteínas recombinantes con los dominios transportadores.

**A.** En *E. coli* K-12 UT5600. **B.** En *E. coli* BL21 (DE3) Omp8. Ambos *Western blots* revelados con anti-E-tag mAb-POD. Ensayo de cambio de movilidad (muestra hervida o no) y degradación con tripsina, para analizar la expresión, plegamiento del dominio transportador y translocación del dominio pasajero a través de la membrana externa de los dominios transportadores seleccionados. Todas las construcciones están correctamente, excepto la derivada de VacA (HEV) que no está bien plegada.

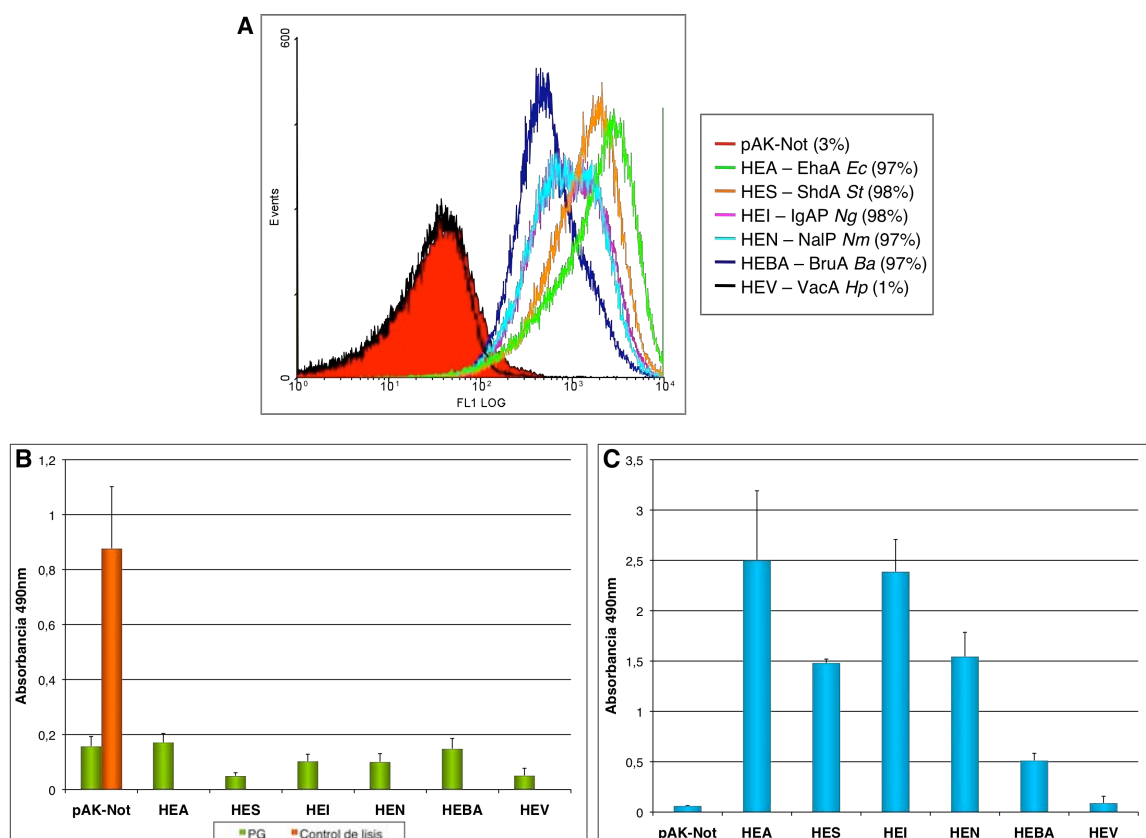
Por último, en el caso de HEV, derivada de VacA, la proteína se expresa y tiene el tamaño correcto, pero no observamos el cambio de movilidad ni la degradación con tripsina (carriles 16-18, Figura 18A). Por ello, suponemos que la proteína no se pliega correctamente en *E. coli*. Existen trabajos previos donde se mencionan problemas con la producción de proteínas de ME de *H. pylori* en *E. coli* e incluso su falta de expresión (Fischer et al., 2001).

## Resultados

Para tratar de minimizar los problemas de plegamiento de las construcciones derivadas de IgAP, NalP, BruA y VacA decidimos expresarlas en una cepa carente de las principales proteínas de ME. Suponiendo que ésto permitiría una mayor disponibilidad de la maquinaria celular que participa en la biogénesis de las proteínas de ME (ver Introducción Apartado 4). Empleamos *E. coli* BL21 (DE3) Omp8, una cepa que no expresa OmpA, OmpC, OmpF y LamB (Prilipov et al., 1998). Para las proteínas derivadas de los ATs EhaA, ShdA, IgAP y NalP el resultado es similar al observado con *E. coli* UT5600 (carriles 1-12, Figura 18B). Con BruA (HEBA) obtuvimos un resultado diferente, ya que la proteína se plegó correctamente de forma casi completa, no apareciendo ninguna banda apreciable correspondiente a la conformación desplegada en la muestra no hervida (carriles 13-14, Figura 18B). Además, todo el pasajero de HEBA fue degradado por la adición de tripsina exógenamente, lo que nos indicó que el dominio transportador estaba correctamente insertado en la ME (carril 15). En cambio, en el caso de VacA (HEV) su expresión en *E. coli* BL21 (DE3) Omp8 no mejoró su plegamiento, ya que no detectamos ninguna banda en el *Western blot*, indicando una rápida degradación de la proteína desplegada en esta cepa (carriles 16-18, Figura 18B).

Para confirmar la translocación del pasajero (6xHis y E-tag) a la superficie bacteriana realizamos ensayos de citometría de flujo y ELISAs con bacterias intactas (sin permeabilizar). Expresamos las construcciones en la cepa *E. coli* UT5600. En el ensayo de citometría de flujo las bacterias están vivas y sin fijar, empleamos un anticuerpo contra el epítipo E y a continuación un anti-ratón conjugado con Alexa-488. Comprobamos que las construcciones derivadas de EhaA, ShdA, IgAP, NalP y BruA translocan el epítipo-E a la superficie de la bacteria. Mientras que para HEV, la construcción derivada de VacA, obtenemos un histograma similar al del vector vacío (pAK-Not) (Figura 19A). La expresión de las construcciones no altera la integridad de la ME mediante ELISA, pues la accesibilidad del peptidoglicano (PG) es similar a la del vector vacío (Figura 19B). El resultado de un ELISA con células intactas y anti-E-tag-POD es el mismo que el del ensayo de citometría de flujo (Figuras 19 A y C).





**Figura 19.** Exposición en superficie del epítipo-E fusionado a los dominios transportadores.

**A.** Análisis por citometría de flujo con anti-E-tag mAb. **B.** ELISA de superficie de células intactas con anti-PG para determinar la accesibilidad del peptidoglicano (PG). El control de lisis es el cultivo de *E. coli* con el vector vacío (pAK-Not) en tampón con 10 mM de EDTA y sonificado. **C.** ELISA de superficie de células intactas con anti-E-tag mAb para conocer el nivel de exposición del epítipo en la superficie.

Los resultados obtenidos tanto por ELISA como por citometría de flujo y la degradación con tripsina demuestran que las secuencias seleccionadas de los ATs son dominios de autotransporte funcionales ya que se expresan, pliegan y son capaces de exponer en la superficie de la bacteria los epítipos con las construcciones HEA, HES, HEI, HEN y HEBA, pero no HEV (Figuras 18 y 19). Por ello a partir de ahora la construcción derivada de VacA no volverá a ser usada en el resto de experimentos.

### 1.3. Caracterización de la estructura cuaternaria.

La estructura terciaria de las proteínas de ME en todos los casos conocidos es un barril  $\beta$  formado por hojas  $\beta$  anfipáticas, excepto Wza (Collins *et al.*, 2007). Pero la estructura cuaternaria es muy variable (ver Figura 3) y quisimos saber si los dominios transportadores seleccionados tienen capacidad de formar

oligómeros en la ME. En estudios anteriores del laboratorio con el dominio transportador de 45 kDa de la IgAP (versión ~10 kDa mayor que la utilizada en HEI) se obtuvieron estructuras oligoméricas en forma de anillo (Veiga et al., 2002).

### 1.3.1. Permeabilidad a los antibióticos por la expresión de los autotransportadores.

Decidimos analizar si la expresión de los ATs en *E. coli* crea poros en la ME *in vivo*. Para ello expresamos las construcciones en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) Omp8 (carente de las principales porinas) y medimos la sensibilidad a antibióticos hidrofílicos. Después de inducir los cultivos en medio líquido, plaqueamos en medio con 50  $\mu$ M IPTG para mantener la expresión de las proteínas y medimos el halo de inhibición que aparece alrededor de los discos de antibióticos (Tabla 6).

Cada uno de los antibióticos empleados ejerce su acción de forma diferente. Los más interesantes en este estudio son la bacitracina y la vancomicina, ya que por su gran tamaño no pueden atravesar la ME por difusión y deben de hacerlo a través de un canal hidrofílico. Como control negativo empleamos el vector vacío (pAK-Not) y como control positivo un plásmido que expresa constitutivamente OmpG. OmpG es una porina monomérica que permite el paso de grandes oligosacáridos (Subbarao y van den Berg, 2006).

**Tabla 6.** Ensayo de sensibilidad a antibióticos.

Antibióticos	Pm (g/mol)	Función	Cantidad (mg/disco)	Halo de inhibición (mm)						
				pAK-Not	OmpG	HEA	HES	HEI	HEN	HEBA
Tetraciclina	481	Síntesis de proteínas (30S)	0,1	17,5 $\pm$ 7,8	19,5 $\pm$ 3,5	16,5 $\pm$ 3,5	18,5 $\pm$ 6,4	16 $\pm$ 5,7	18 $\pm$ 5,7	16 $\pm$ 4,5
Eritromicina	733	Síntesis de proteínas (50S)	0,2	8 $\pm$ 2,8	12 $\pm$ 2,8	7 $\pm$ 2,8	8 $\pm$ 1,4	7,5 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 2,1	9 $\pm$ 1,4
Bacitracina	1421	Síntesis de peptidoglicano	0,5	6,5 $\pm$ 3,5	10 $\pm$ 2,8	7 $\pm$ 2,8	2,5 $\pm$ 2	4,5 $\pm$ 0,7	8 $\pm$ 4,2	6 $\pm$ 3
Vancomicina	1485	Síntesis de peptidoglicano	0,2	7,5 $\pm$ 2	13 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0	5 $\pm$ 5,6	7,5 $\pm$ 3,5	9,5 $\pm$ 0,7	7 $\pm$ 1,7

Nota: La medida que aparece es la distancia en mm desde el borde del disco Whatman hasta el borde del halo de inhibición  $\pm$  desviación estándar.

En todos los casos las células que expresan OmpG son más sensibles a los antibióticos (Tabla 6), destacando el efecto tanto con la bacitracina como con la vancomicina, como ya comentamos por su elevado peso molecular. El resto de las construcciones no dan diferencias significativas con respecto al control negativo (pAK-Not).

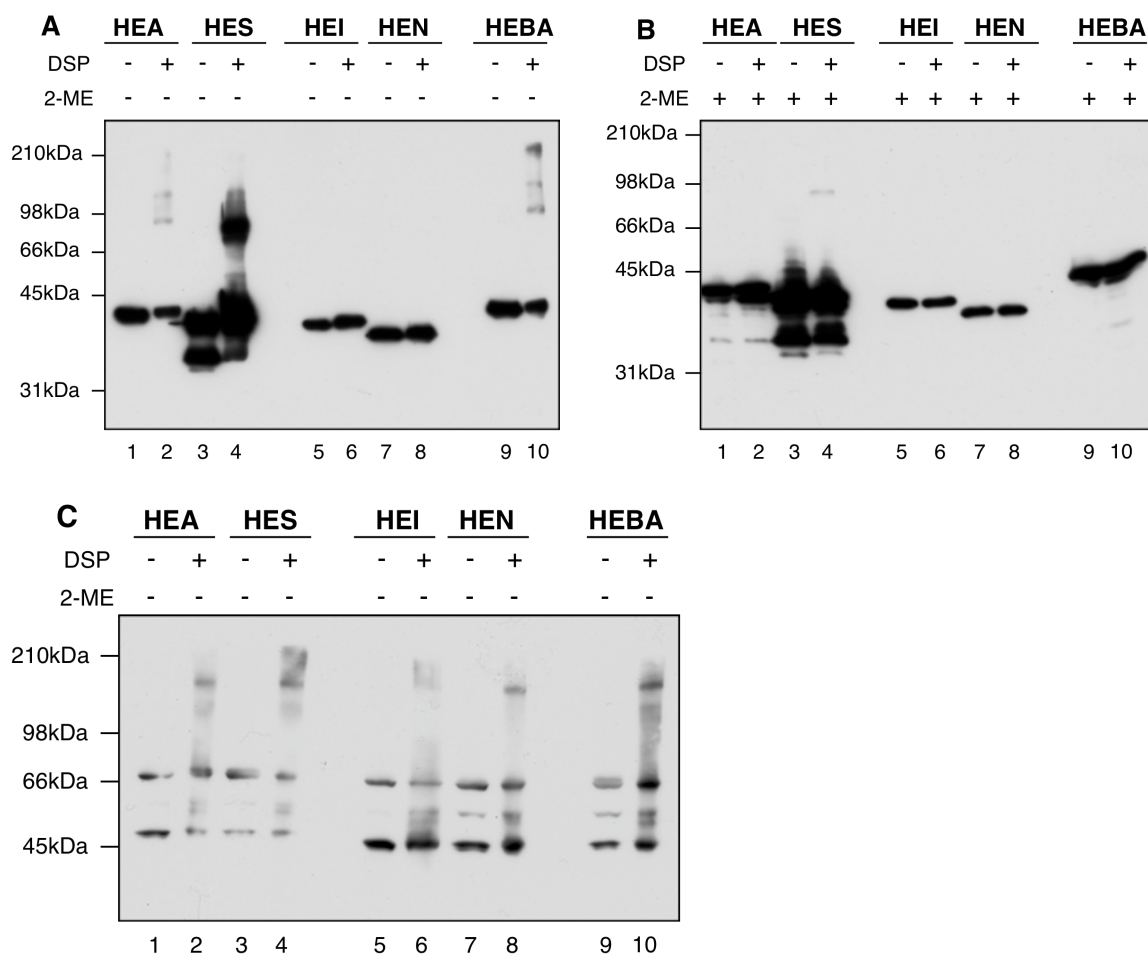
También medimos la sensibilidad a los antibióticos mediante diluciones seriadas en placas multipocillo para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), definida como la menor concentración que inhibe completamente el crecimiento de las bacterias. El resultado de estos experimentos no reveló cambios significativos en el MIC por la expresión de los ATs en comparación con el control negativo (pAK-Not) (resultados no mostrados).

### **1.3.2. Análisis de la estructura cuaternaria *in vivo*.**

Para intentar obtener alguna evidencia de la posible existencia de complejos oligoméricos de los ATs *in vivo* se realizaron experimentos de entrecruzamiento de proteínas (*cross-linking*), usando ditiolbis(succinimidil propionato) (DSP; espaciador de 12 Å y que entrecruza grupos amino) (ver Materiales y Métodos). El entrecruzamiento producido por la acción del DSP contiene un puente disulfuro que se reduce en presencia de 2-mercaptoetanol (2-ME). Llevamos a cabo la expresión de las construcciones de los ATs en *E. coli* UT5600 y realizamos el ensayo de entrecruzamiento con DSP (Figura 20). Como control positivo interno del entrecruzamiento empleamos TolC, una proteína de ME que en condiciones nativas forma un trímero de ~155 kDa (ver Figura 3E). En presencia de DSP (Figura 20C) se aprecia la banda correspondiente al trímero, mientras que en ausencia de DSP sólo se detecta el monómero de ~50 kDa.

Se observa la aparición de bandas de alto peso molecular en el caso de las construcciones derivadas de los ATs EhaA (HEA), ShdA (HES) y BruA (HEBA) (Figura 20A, carriles 2, 4 y 10 respectivamente). Dichas bandas aparecen específicamente en presencia de DSP y desaparecen si la muestra se trata con 2-ME (Figura 20B, carriles 2, 4, y 10 respectivamente).

## Resultados



**Figura 20.** Ensayo de entrecruzamiento de los autotransportadores *in vivo*.

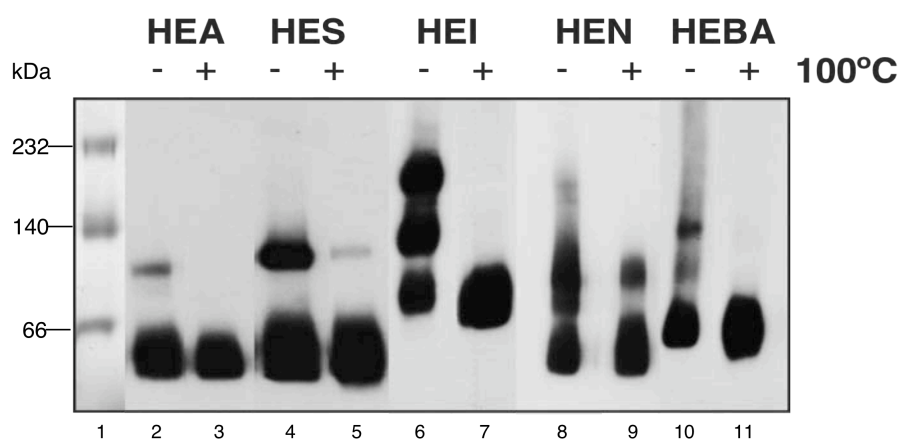
**A.** Western blot con anti-E-tag mAb-POD de las muestras de extractos totales de células de *E. coli* UT5600 que expresaban las construcciones de los ATs y que habían sido tratadas con el agente entrecruzante DSP (cuando se indica, +) y en ausencia de 2-ME. **B.** Western blot con anti-E-tag mAb-POD de las mismas muestras en presencia de 2-ME. **C.** Western blot con anti-TolC de las muestras de extractos totales de células de *E. coli* UT5600 que expresaban las construcciones de los ATs y que habían sido tratadas con el agente entrecruzante DSP y en ausencia de 2-ME. Todas las muestras hervidas durante 10 min a 100 °C.

En el caso de HES es clara la formación de una banda de entrecruzamiento con un tamaño que podría corresponder a la formación de un dímero. En HEA y HEBA se aprecian también bandas de entrecruzamiento que podrían corresponder al dímero y a formas con mayor grado de oligomerización (trímeros y tetrámeros). Estas bandas de HEA y HEBA son de menor intensidad que la del dímero de HES, pero son claramente específicas de la presencia de DSP y son sensibles a 2-ME. No se aprecian bandas de alto peso molecular originadas por entrecruzamiento con DSP en las proteínas derivadas de los ATs IgAP y NalP (HEI y HEN, respectivamente) (Figura 20A, carriles 6 y 8). Ésto puede ser debido

a la ausencia de formas oligoméricas de HEI y HEN *in vivo* o a que el DSP no es capaz de entrecruzarse con estas proteínas *in vivo*.

### 1.3.3. Análisis de la estructura cuaternaria *in vitro*.

Una técnica útil para conocer la estructura cuaternaria de proteínas de membrana es el *blue native*-PAGE (BN-PAGE). En ella se emplean geles en gradiente de poliacrilamida y la migración de las proteínas se da en condiciones nativas y en función de su tamaño, gracias a la carga negativa que les confiere la unión de moléculas de azul de Coomassie de forma homogénea en función de la masa de la proteína (ver Materiales y Métodos). Para ello purificamos todos los transportadores expresados en *E. coli* UT5600 desde la fracción de ME, solubilizados en detergente Zwittergent 3-14, y mediante cromatografía con resinas de metales inmovilizados gracias a la presencia del epítipo 6xHis en las construcciones. Tras la purificación analizamos el cambio de movilidad en geles de SDS-PAGE para comprobar que la proteína purificada estaba plegada correctamente y mantenía su conformación nativa (datos no mostrados). Las proteínas purificadas se resolvieron en un gel BN-PAGE. Para aumentar la sensibilidad del BN-PAGE realizamos una transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF para su inmunodetección con anti-E-tag mAb (Figura 21).



**Figura 21.** *Blue native*-PAGE (BN-PAGE) de las proteínas HEA, HES, HEI, HEN y HEBA purificadas de membrana externa de *E. coli* UT5600.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se reveló su presencia con el anticuerpo anti-E-tag mAb-POD. Se incluye una muestra hervida en cada proteína como control para observar la sensibilidad al calor de las bandas de alto peso molecular correspondientes a la dimerización u oligomerización de los dominios transportadores.

## Resultados

La banda mayoritaria del dominio transportador de EhaA (HEA) corresponde al monómero y además aparece una banda minoritaria que correspondería al dímero (carril 2). Dicha banda desaparece al hervir la muestra y nos sirve así de control para saber que la banda del dímero no aparece cuanto la proteína está desnaturalizada (carril 3).

El dominio transportador derivado de ShdA (HES) presenta una banda mayoritaria correspondiente al monómero y otra banda muy abundante correspondiente al dímero. Al hervir la proteína, la banda del dímero se ve muy reducida (carriles 4-5).

En el caso de la IgAP (HEI), aparecen varias bandas en proporciones similares (carril 6). La banda de tamaño superior que aparece alrededor de 200 kDa, podría corresponder a un hexámero, similar a la descrita en trabajos anteriores del laboratorio con la construcción HE $\beta$  (derivada de la IgAP) (Veiga et al., 2002). La banda inferior podría ser el monómero, aunque su movilidad se corresponde a la de un dímero. En ese caso sería un dímero muy estable que resiste el hervido en ausencia de SDS (carril 7).

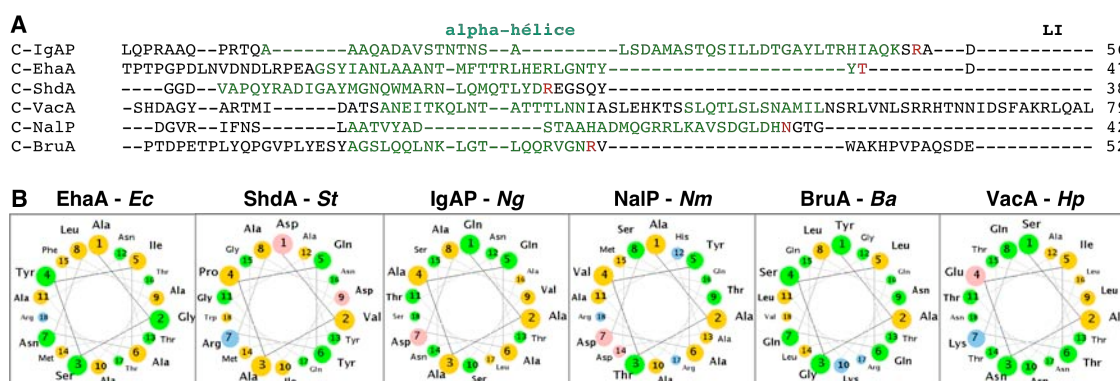
El dominio transportador de NalP (HEN) presenta la banda mayoritaria correspondiente al monómero, lo que estaría de acuerdo con los datos obtenidos del cristal (Oomen et al., 2004) (carril 8), aunque también aparece una banda que correspondería a un dímero en una proporción significativa. Dicha banda es muy resistente a la desnaturalización por calor y no podemos descartar que sea una interacción no natural (carril 9).

En el dominio transportador de BruA (HEBA) la banda principal también es el monómero, aunque aparecen al menos una segunda banda en proporción significativa correspondiente al dímero (carril 10). Al hervir la muestra, la única banda que aparece es la correspondiente al monómero (carril 11).

En base a todos los resultados obtenidos mediante ensayos de permeabilidad a antibióticos, entrecruzamiento *in vivo* y BN-PAGE, podemos concluir que la formación de estructuras oligoméricas en la ME por parte de los dominios transportadores de los ATs no es una característica conservada. Se observa variabilidad entre los distintos ATs y, aunque existen ATs que forman oligómeros (IgAP), las estructuras predominantes en la ME son el monómero y el dímero.

#### 1.4. Estudio del papel de la hélice $\alpha$ del dominio transportador.

La presencia de una hélice  $\alpha$  dentro del dominio transportador parece ser una característica conservada en los ATs clásicos. Por lo tanto, quisimos analizar cual es su papel en la translocación del dominio pasajero en nuestras construcciones. Es importante recordar que, con la excepción de NalP (del que disponemos de la estructura real (Oomen et al., 2004)), la hélice  $\alpha$  de nuestras construcciones es sólo una predicción.



**Figura 22.** Secuencia de las hélices  $\alpha$  predichas de los dominios transportadores.

**A.** Secuencia de las predicciones de hélice  $\alpha$  de los dominios transportadores (en verde). En las deleciones de la hélice  $\alpha$  de los dominios transportadores eliminamos hasta el aminoácido en rojo. Para los intercambios de la hélice  $\alpha$  sustituimos desde el comienzo de ésta (en verde) hasta la primera hoja  $\beta$  del dominio transportador. **B.** Análisis de la anfipaticidad de las hélices  $\alpha$  con el servidor web Helical Wheel. Aminoácidos no polares en amarillo, polares o sin carga en verde, ácidos en rosa y básicos en azul.

Analizamos la posible anfipaticidad de las hélices  $\alpha$  predichas para los dominios transportadores con el servidor web Helical Wheel (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>) y comprobamos que la anfipaticidad no es una característica común, ya que solamente parecen claras dos regiones con polaridad bien diferenciadas en el caso de VacA (Figura 22B).

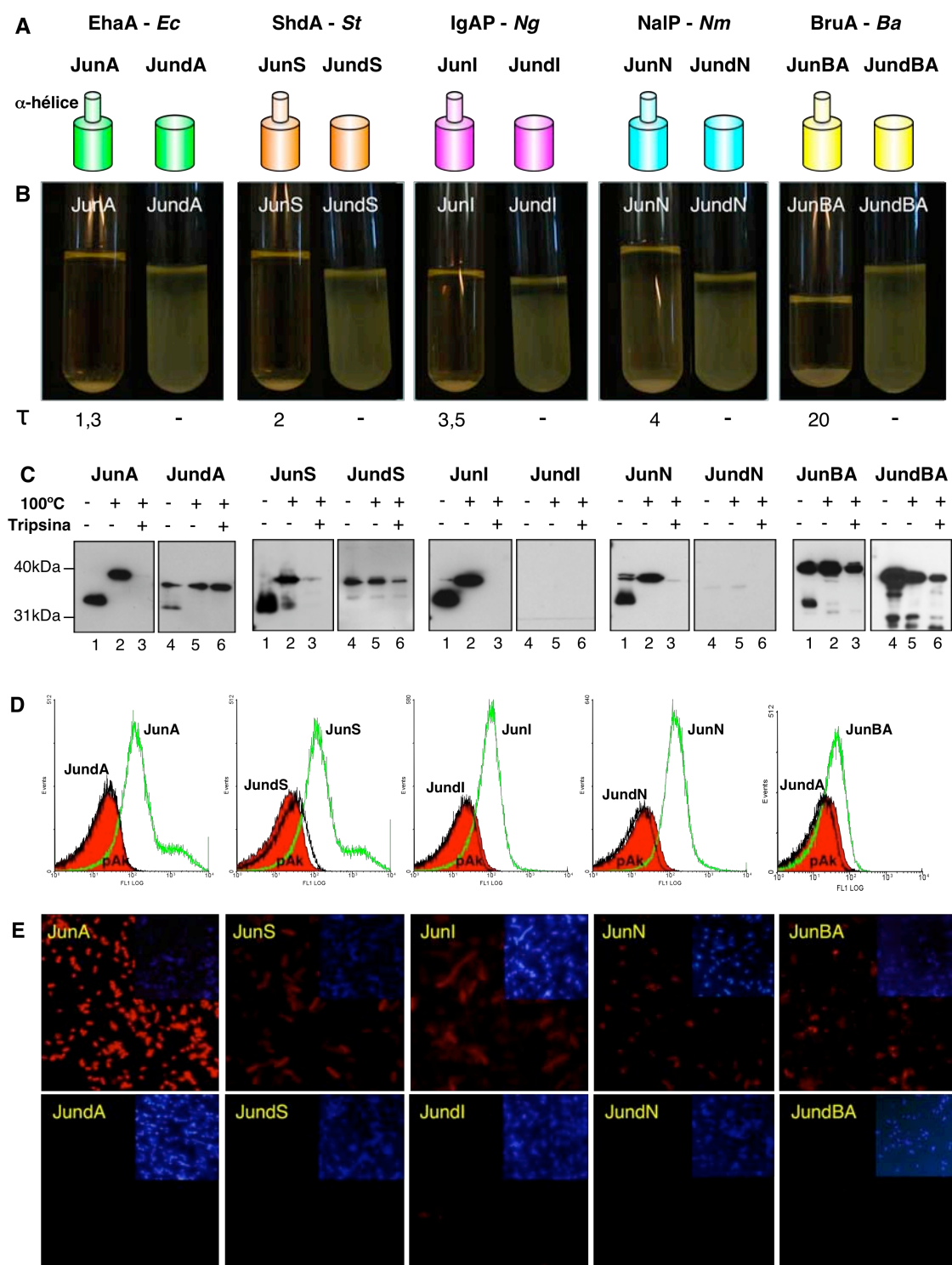
### 1.4.1. Mutantes de delección en la hélice $\alpha$ .

Inicialmente sustituimos el epítipo 6xHis (6H) por la cremallera de leucinas (CL) del factor de transcripción c-Jun en todas nuestras construcciones (exceptuando HEV) y las renombramos “Jun-inicial del AT” (contienen la hélice  $\alpha$ ). Las CL expuestas en la superficie de distintas bacterias dimerizan y tiene lugar la agregación de las bacterias presentes en el cultivo, siendo ésta una sencilla técnica para monitorizar la translocación del pasajero a la superficie bacteriana (Veiga et al., 2003a). Empleamos la CL de c-Jun que es capaz tanto de homodimerizar como de heterodimerizar con la CL de c-Fos (Abate et al., 1990). A continuación delecionamos las hélices  $\alpha$  de estas construcciones (ver Figura 22) y las nombramos “Jund-inicial del AT” (delección de la hélice  $\alpha$ ). Un esquema de todas estas construcciones aparece en la Figura 23A. Analizamos la expresión de todas las construcciones (con y sin la hélice  $\alpha$ ) en *E. coli* UT5600 mediante ensayo de agregación, *Western blot*, ensayo de citometría de flujo e inmunofluorescencia (Figura 23).

Realizamos ensayos de agregación empleando cultivos mixtos con bacterias expresando Fos $\beta$  (ver Materiales y Métodos). Observamos que sólo los cultivos de las construcciones con la hélice  $\alpha$  son capaces de agregar (Figura 23B) aunque con diferentes tiempos de agregación (parámetro  $\tau$ ).

Analizamos los niveles de expresión y comprobamos que todas las construcciones derivadas de los dominios transportadores de EhaA (JunA), ShdA (JunS), IgAP (JunI), NalP (JunN) y BruA (JunBA) con la CL y la hélice  $\alpha$  se expresan correctamente (Figura 23C, carriles 1-3 de cada AT). Se puede observar el cambio de movilidad y la degradación con tripsina para cada una de ellas. En el caso de BruA (JunBA) una parte de la proteína no se degrada pues no está expuesta. Este fenómeno ya lo apreciamos al expresar HEBA (con el epítipo 6H, ver Figura 18A), pero es más acusado en el caso de JunBA. Aquéllas construcciones con mejores niveles de expresión (p. Ej. JunA y JunS) presentan agregaciones más rápidas de las bacterias (parámetro  $\tau$ ).





**Figura 23.** Expresión de las construcciones con y sin la hélice  $\alpha$  de los dominios transportadores.

**A.** Esquema de las construcciones con y sin la hélice  $\alpha$  de los dominios transportadores (panel superior). **B.** Ensayo de agregación. En la parte inferior aparece el parámetro  $\tau$ , que corresponde al tiempo en horas que tarda el cultivo en llegar a una  $DO_{600} \sim 0,4$  partiendo de una  $DO_{600} \sim 1,5$ . Las fotografías están tomadas tras 24 horas de incubación. **C.** Western blot con anti-E-tag mAb-POD para analizar el cambio de movilidad y la degradación con tripsina. **D.** Análisis de citometría de flujo con anti-E-tag mAb. **E.** Ensayo de

## Resultados

inmunofluorescencia, las imágenes muestran en rojo la tinción con anti-E-tag mAb. En la esquina superior derecha se puede ver la tinción del DNA con DAPI de las bacterias de ese mismo campo.

Por el contrario la delección de la hélice  $\alpha$  afecta claramente al plegamiento de la proteína y a su estabilidad (Figura 23C, carriles 4-6 de cada AT). Sólo en el caso de la construcción derivada de EhaA (JundA) se aprecia en el ensayo de cambio de movilidad una parte de la proteína correctamente plegada. Además, para las delecciones de IgAP (JundI) y NaIP (JundN), los niveles de expresión son muy bajos. De las tres construcciones que se expresan a niveles altos (JundA, JundS y JundBA) la degradación con tripsina es mínima, lo que indica que el pasajero no está expuesto en la superficie.

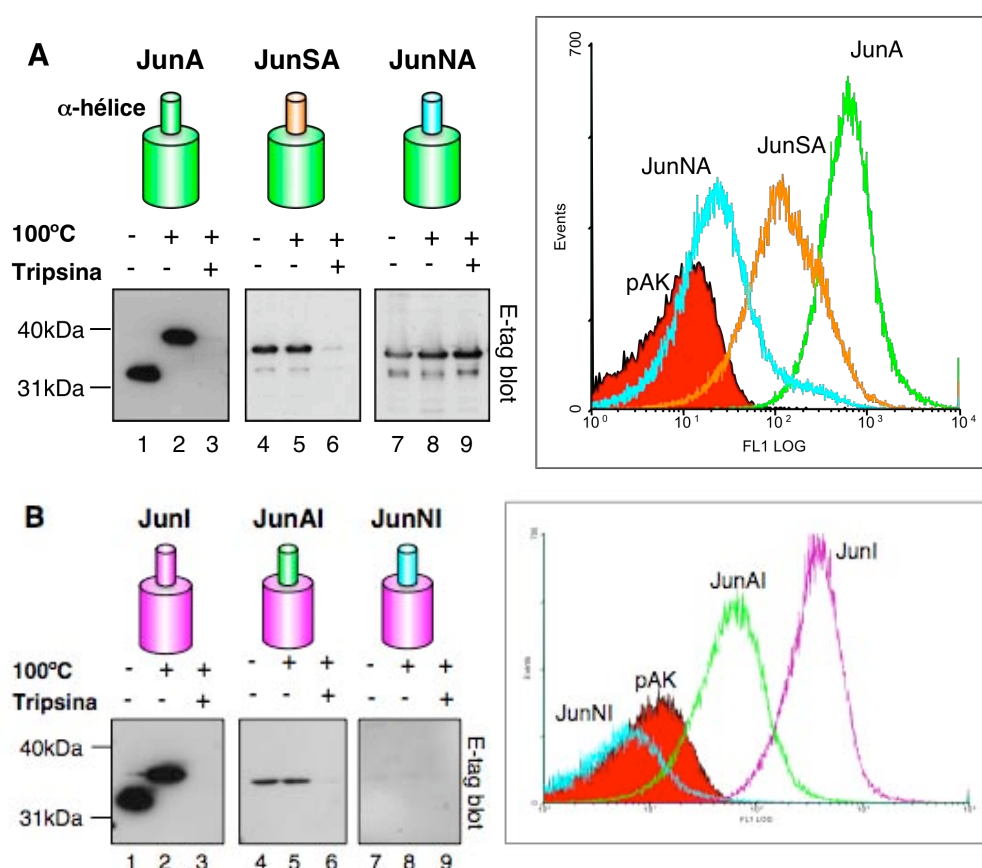
Para poder confirmar la presencia o no del pasajero en la superficie de la bacteria, llevamos a cabo un análisis de citometría de flujo con anticuerpo anti-E-tag (Figura 23D). Los resultados son coincidentes con el ensayo de degradación con proteasas y el cambio de movilidad. Las construcciones con la hélice  $\alpha$  están expuestas en la superficie bacteriana, en menor medida la derivada de BruA (JunBA), como ya nos indicó su degradación parcial con tripsina. En cambio, las construcciones sin la hélice  $\alpha$  no se detectan. También la microscopía de inmunofluorescencia con el mismo anticuerpo (Figura 23E) nos mostró resultados coincidentes con la citometría de flujo.

Todos estos resultados demuestran que la hélice  $\alpha$  es necesaria para la exposición en la superficie de la bacteria de los dominios pasajeros y para la estabilidad del dominio transportador de los ATs.

### **1.4.2. Intercambios de la hélice $\alpha$ entre dominios transportadores.**

Como hemos observado en la sección anterior los dominios transportadores sin la hélice  $\alpha$  no exponían en la superficie de la bacteria los epítomos y eran inestables en presencia de SDS (sin cambio de movilidad). Nos preguntamos si el intercambio de hélices  $\alpha$  entre dominios transportadores sería capaz de estabilizar el barril  $\beta$  y rescatar su correcto plegamiento y función en secreción.

Para ello, decidimos emplear los barriles  $\beta$  de EhaA y IgAP, y realizar en cada uno de ellos dos quimeras de intercambio de hélices  $\alpha$ , una con la hélice  $\alpha$  de un AT del mismo grupo de proteobacterias y otras con la correspondiente a un AT alejado filogenéticamente. Así reemplazamos en el dominio transportador de EhaA su hélice  $\alpha$  por la de ShdA y por la de NalP, construyendo JunSA y JunNA respectivamente (Figura 24A). Hicimos también dos reemplazamientos de la hélice  $\alpha$  de IgAP por la de EhaA y la de NalP, construyendo JunAI y JunNI respectivamente (Figura 24B).



**Figura 24.** Expresión de los intercambios de la hélice  $\alpha$  entre los dominios transportadores.

Cambio de movilidad y degradación con tripsina a la izquierda, *Western blot* con anti-E-tag mAb-POD; ensayo de citometría de flujo con anti-E-tag mAb a la derecha. **A.** Intercambios de la hélice  $\alpha$  de los dominios transportadores en el barril  $\beta$  de EhaA. **B.** Intercambios de la hélice  $\alpha$  de los dominios transportadores en el barril  $\beta$  de IgAP. Se mantiene el código de colores para indicar de donde proviene la hélice  $\alpha$  y a quién corresponde el histograma en el ensayo de citometría de flujo.

Observamos que la construcción con la hélice  $\alpha$  de ShdA en el barril  $\beta$  de EhaA (JunSA) era accesible a la degradación con tripsina *in vivo* y daba una señal positiva de exposición del epítipo E en citometría de flujo (Figura 24A). Los

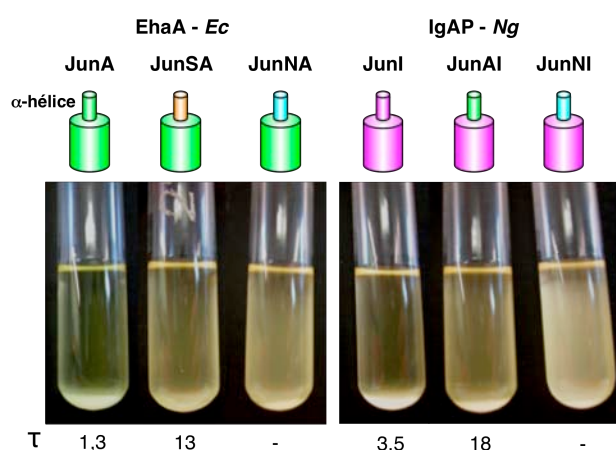
## Resultados

niveles de expresión y exposición en la superficie de JunSA son inferiores a los obtenidos por el transportador *wt* (JunA) pero claramente superiores al control negativo o a los obtenidos con la delección JundA (comparar Figuras 23 y 24). Sin embargo, pese a que el pasajero de JunSA está expuesto en la superficie de la célula, no observamos el cambio de movilidad en esta construcción (por encima de los niveles observados para la delección JundA) lo que indica que es sensible al SDS y por lo tanto muy inestable. En cambio con la construcción con la hélice  $\alpha$  de NalP en el barril  $\beta$  de EhaA (JunNA) no se observa degradación con tripsina y en el ensayo de citometría es claramente negativo. Además, JunNA tampoco aparece correctamente plegada siendo inestable en SDS (Figura 24A, carriles 7-9).

La distancia filogenética entre los dominios transportadores de EhaA y ShdA podría explicar el resultado positivo del intercambio JunSA y el resultado negativo obtenido con JunNA. Por ello realizamos dos construcciones con el barril  $\beta$  de IgAP conteniendo la hélice  $\alpha$  “alejada” de EhaA (JunAI) o la hélice  $\alpha$  “cercana” de NalP (JunNI). La expresión de ambas quimeras (Figura 24B) arrojó datos positivos de exposición para JunAI, tanto por accesibilidad a tripsina como por citometría de flujo, aunque la proteína se expresaba a bajos niveles y era sensible al SDS careciendo de cambio de movilidad en geles SDS-PAGE. Por el contrario, el intercambio entre los transportadores de *Neisseria*, JunNI, fue negativo en todos los experimentos de exposición y sus niveles de expresión fueron aún menores.

Los resultados del cambio de movilidad y la degradación con tripsina coinciden con los del ensayo de citometría de flujo, sólo aquellas que se degradan parcialmente dan una señal alta en el ensayo de citometría. Con las mismas construcciones realizamos un ensayo de accesibilidad del PG mediante ELISA y en todos los casos la señal era similar a la del vector vacío (resultados no mostrados), por lo que la expresión de estas construcciones (con o sin la hélice  $\alpha$ ) no altera la permeabilidad de la ME.

Finalmente la exposición en la superficie de las quimeras JunSA y JunAI fue también confirmada en ensayos de agregación en cultivos mixtos con bacterias expresando Fos $\beta$  (ver Materiales y Métodos). En este ensayo pudimos observar que sólo las construcciones *wt* y los intercambios con un nivel de exposición próximo a las construcciones *wt* en citometría de flujo (JunSA y JunAI) son capaces de inducir la agregación clara del cultivo aunque con cinéticas más lentas (parámetro  $\tau$ , Figura 25).



**Figura 25.** Ensayo de agregación de las construcciones *wt* y los intercambios de la hélice  $\alpha$  de los dominios transportadores.

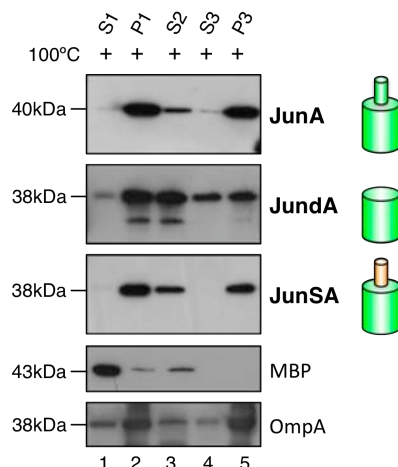
En la parte superior se muestra el esquema de las construcciones que se están analizando siguiendo el código de colores descrito en la Figura 24. En la parte inferior aparece el parámetro  $\tau$ , que corresponde al tiempo en horas que tarda el cultivo en llegar a una  $DO_{600} \sim 0,4$ . Cuando no se indica el parámetro  $\tau$  es porque el cultivo no agrega después de 24 horas. Las fotografías están tomadas tras 24 h de incubación.

### 1.4.3. Localización subcelular y estabilidad de la quimera JunSA.

Debido a que la quimera de intercambio JunSA se exponía en la superficie de la bacteria a niveles significativos quisimos confirmar si estaba correctamente integrada en la ME. Para ello realizamos un fraccionamiento celular (ver Materiales y Métodos) de las bacterias que expresaban JunSA y en paralelo de bacterias expresando JunA (control positivo) o la delección *JundA*, para poder comparar su comportamiento. Como se observa en la Figura 26, tanto JunA como la quimera JunSA aparecen primero en la fracción correspondiente a material insoluble y membranas totales (P1) y posteriormente de forma mayoritaria en la fracción de proteínas integrales de ME (P3), ya que resisten la extracción con detergentes neutros (S2) y con urea (S3). Sin embargo, la

## Resultados

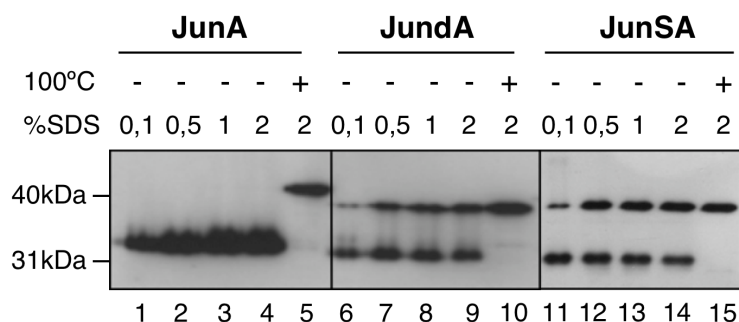
deleción JundA, aunque aparece también en la fracción insoluble y membranas (P1), se extrae mayoritariamente con detergente neutros (S2) y urea (S3), sólo una pequeña parte se encuentra como proteína integral de ME (P3)



**Figura 26.** Fraccionamiento subcelular de las construcciones JunA, JundA y JunSA.

Empleamos como control del fraccionamiento celular la proteína de unión a maltosa (MBP) que es una proteína de periplasma y OmpA que es una proteína de ME. *Western blot* con anticuerpos específicos contra cada una de las proteínas y con anti-E-tag mAb-POD para las construcciones derivadas de EhaA (JunA, JundA y JunSA). Nomenclatura: S1, extracto celular soluble; P1, material insoluble y membranas totales; S2, proteínas de membrana solubilizadas con Triton X-100; S3, proteínas de membrana solubilizadas con urea y P3, proteínas integrales de ME, resisten la extracción con urea.

Con las fracciones de ME anteriores al tratamiento con urea (fracción P2, ver Materiales y Métodos) llevamos a cabo un ensayo de sensibilidad a SDS, mediante un ensayo de cambio de movilidad con concentraciones crecientes de SDS (0,1-2%) (Figura 27). En este ensayo observamos que mientras la proteína *wt* JunA es resistente a altas concentraciones de SDS (2%), la quimera JunSA y la deleción JundA muestran una mayor sensibilidad y se desnaturalizan a concentraciones de SDS mayores al 0,1%. Por lo tanto, el intercambio de la hélice  $\alpha$ , JunSA, es capaz de crear una proteína bien localizada en ME y funcional en términos de presentación en la superficie, pero no regenera la estabilidad al SDS de la proteína *wt* JunA. Pese a ello, a bajas concentraciones de SDS, tanto JundA como JunSA presentes en la fracción de ME (P2) muestran un claro cambio de movilidad indicativo de una conformación en barril  $\beta$ .



**Figura 27.** Sensibilidad al SDS de las construcciones JunA, JundA y JunSA.

La fracción de ME de bacterias expresando las construcciones se incubó a temperatura ambiente con concentraciones crecientes de SDS. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida con SDS y se revelaron mediante *Western blot* con anti-E-tag mAb-POD.

En conclusión, es posible intercambiar en algunos casos las hélices  $\alpha$  de los dominios transportadores restaurando parcialmente la capacidad de exposición de los pasajeros en la superficie de la bacteria y mejorando la localización en ME de las quimeras. Sin embargo, estos intercambios no son capaces de aumentar la estabilidad del barril  $\beta$  en ausencia de su hélice  $\alpha$ .

### 2. Papel de las chaperonas periplásmicas y el complejo Bam de membrana externa en el dominio transportador.

Quisimos conocer el papel específico de cada una de las principales chaperonas periplásmicas y el complejo Bam en el ensamblaje e inserción de los dominios transportadores de los ATs clásicos seleccionados. Empleamos como controles OmpA, una proteína de ME y GroEL una proteína citoplásmica que no se ve afectada por mutantes en chaperonas periplásmicas o el complejo Bam y que además, podemos usar como control de carga en los experimentos.

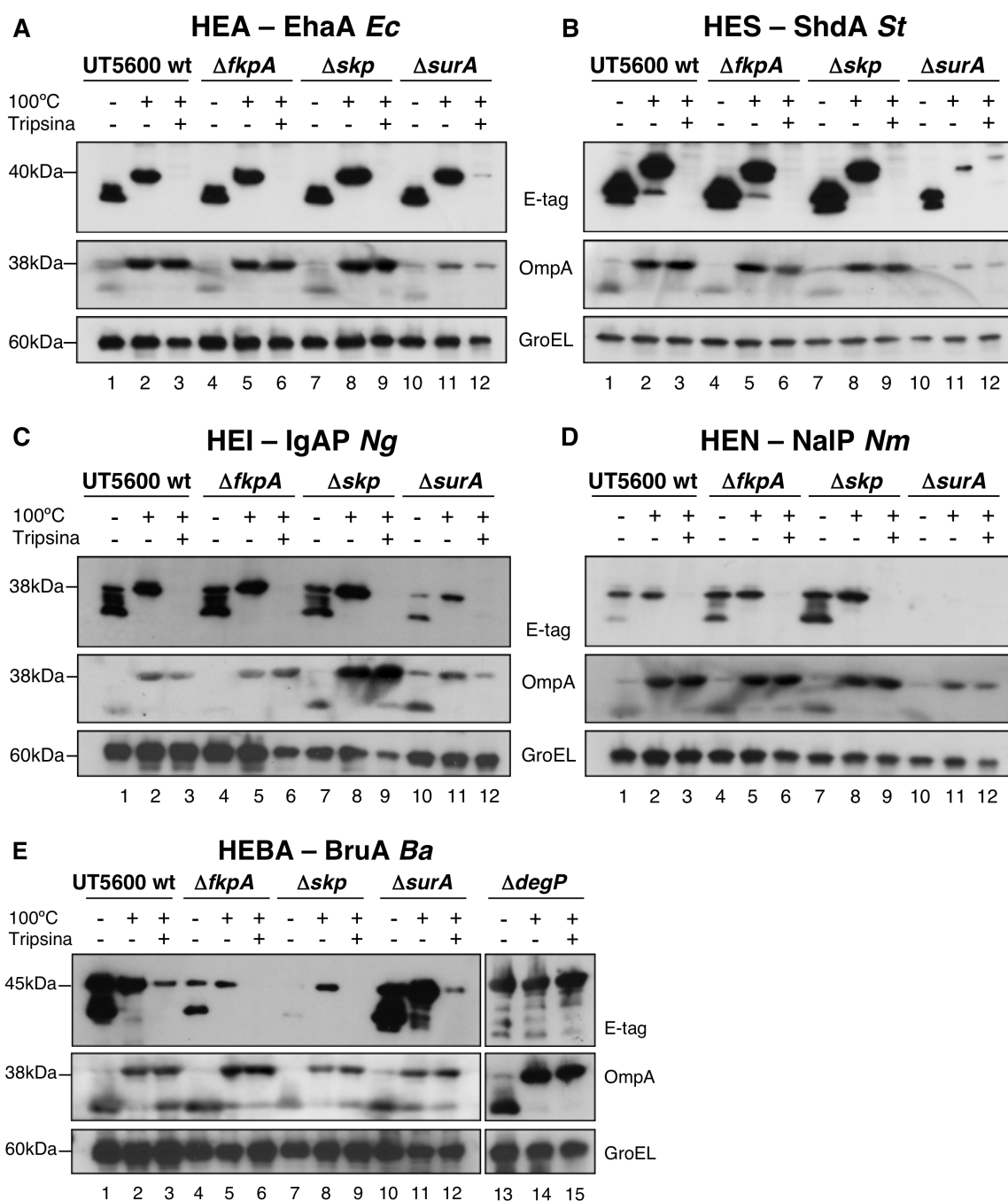
#### 2.1. Expresión de los dominios transportadores en mutantes nulos en las chaperonas periplásmicas FkpA, Skp, SurA y DegP.

Primero analizamos el efecto de mutaciones nulas en las chaperonas periplásmicas en la expresión de los dominios transportadores. Para ello llevamos a cabo inicialmente la inducción de los plásmidos en cepas mutantes en *fkpA*, *skp* y *surA* derivadas de *E. coli* UT5600 y realizamos ensayos de cambio de movilidad y degradación con tripsina empleando como control la cepa silvestre parental.

La expresión de HEA (derivada de EhaA) no se vio afectada en mutantes nulos sencillos para estas chaperonas periplásmicas (Figura 28A), mientras OmpA sólo se vio afectada por el mutante nulo en *surA* (carriles 10-12), tal y como ya se había descrito en (Sklar et al., 2007b). GroEL no se vio alterada en ningún caso. Esto sugiere que HEA podría emplear indistintamente la ruta SurA o Skp/DegP para su integración en la ME.

Por el contrario, la expresión de HES (ShdA), HEI (IgAP) y HEN (NalP) se vio muy reducida en el mutante *surA*, al igual que OmpA (Figura 28B, 28C y 28D, respectivamente). La expresión de HEN es la más sensible a la ausencia de SurA y los niveles de proteína alcanzados son casi indetectables. En el resto de mutantes la expresión de estos ATs es similar a la cepa *wt*. Por lo tanto, HES, HEI y HEN parecen emplear fundamentalmente la ruta SurA en *E. coli*.





**Figura 28.** Expresión de los dominios transportadores en mutantes nulos para las principales chaperonas periplásmicas.

Cambio de movilidad y degradación con tripsina en el panel superior, *Western blot* con anti-E-tag mAb-POD. *Western blot* con anti-OmpA (panel intermedio) y con anti-GroEL mAb-POD (panel inferior). **A.** Expresión de HEA (EhaA). **B.** Expresión de HES (ShdA). **C.** Expresión de HEI (IgAP). **D.** Expresión de HEN (NalP). **E.** Expresión de HEBA (BruA).

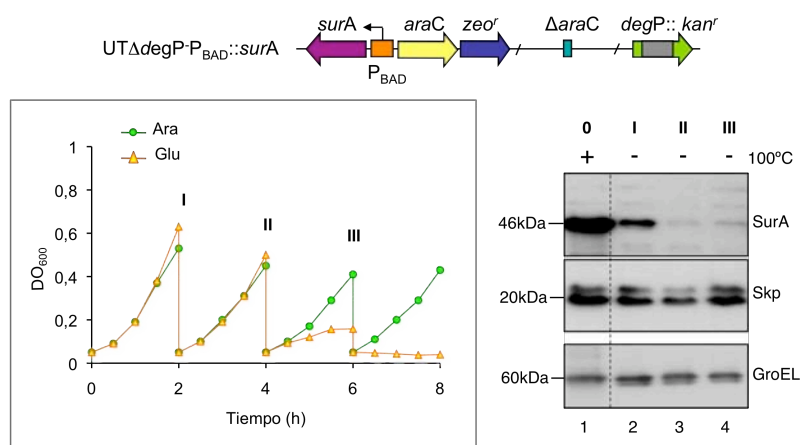
La expresión de HEBA (BruA), en cambio, se encontró muy afectada negativamente por el mutante *skp* y en menor medida también en el mutante *fkpA* (Figura 28E). Además, observamos un aumento de expresión de HEBA en el mutante *surA* (carriles 10-12). Estos datos sugerían que HEBA empleaba

fundamentalmente la ruta Skp/DegP para su transporte a la ME. Por ello decidimos analizar la expresión de HEBA en un mutante *degP*. Los mutantes nulos en Skp o DegP bloquean la ruta Skp/DegP, pero DegP además de chaperona tiene una función como proteasa degradando proteínas no plegadas correctamente en el periplasma (Sklar et al., 2007b). En este mutante, pudimos confirmar la dependencia de HEBA de la ruta Skp/DegP ya que se acumula la forma desplegada de la misma (Figura 28E, carriles 13-15). Por lo tanto, la secreción de HEBA depende fuertemente de la ruta Skp/DegP y de la PPlasa FkpA.

En conclusión, *E. coli* emplea diferentes rutas de chaperonas periplásmicas (SurA, Skp/DegP o ambas) para secretar los dominios transportadores estudiados. Aunque la ruta SurA es usada principalmente, su uso no es un rasgo que se mantiene siempre, pues el dominio transportador de EhaA es capaz de emplear también la ruta Skp/DegP y BruA prefiere esta última y la PPlasa FkpA frente a SurA.

### **2.2. Expresión de los dominios transportadores en un mutante condicional para las chaperonas periplásmicas SurA y DegP.**

Es muy interesante llevar a cabo un estudio en un mutante doble condicional *surA degP* en el que bloqueamos ambas rutas simultáneamente. Un mutante doble nulo *surA* y *degP* bloquea las dos vías de plegamiento de las proteínas de ME y por lo tanto no es viable. Por ello, realizamos sobre un mutante nulo en *degP* un mutante condicional en *surA* reemplazando su promotor natural por el promotor regulable  $P_{BAD}$  (Roux et al., 2005)(Figura 29). Así, obtuvimos una cepa (*E. coli* UT*degP*- $P_{BAD}$ ::*surA*) que expresa SurA cuando crece en un medio con arabinosa y no la produce cuando hay glucosa en el medio (Figura 29). Al mantener las bacterias en fase exponencial mediante diluciones del cultivo en medio con glucosa, nos aseguramos que la proteína cuyo promotor estamos bloqueando reduce drásticamente sus niveles en la célula. La cepa *E. coli* UT*degP*- $P_{BAD}$ ::*surA* en presencia de glucosa en el medio detiene su crecimiento después de la dilución III, debido a que están bloqueadas las rutas SurA y Skp/DegP (Figura 29).



**Figura 29.** Análisis de la cepa *E. coli* *UTdegP-P<sub>BAD</sub>::surA*.

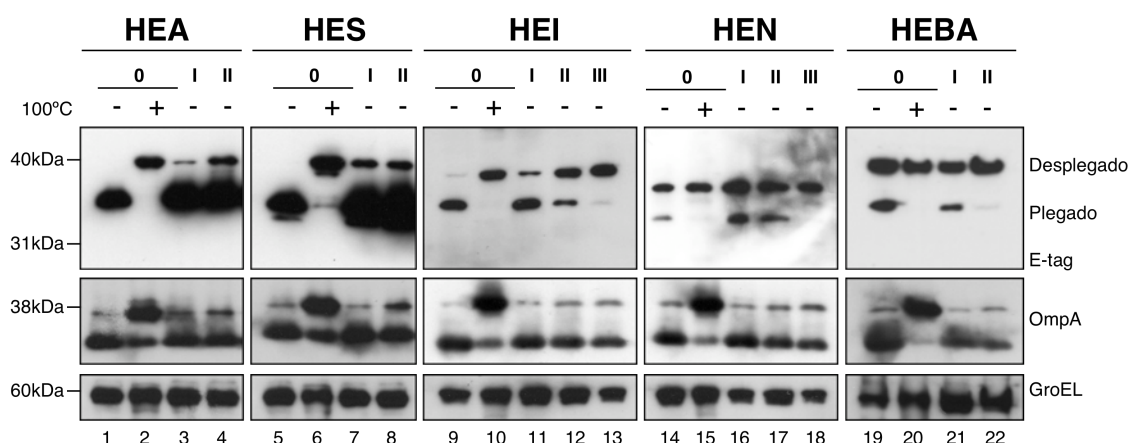
En la parte superior aparece la organización cromosómica del mutante y en la parte inferior la curva de crecimiento en presencia de arabinosa (círculos verdes) o glucosa (triángulos amarillos). En números romanos (I, II, III) se indica el punto en el que los cultivos son diluidos para mantener el crecimiento exponencial y en el que se toma la muestra a analizar en un *Western blot* en la inducción de las construcciones. El preinoculo, siempre con arabinosa se indica como 0. En el *Western blot* se aprecia la caída de SurA y un ligero aumento de Skp debido a la inducción de estrés extracitoplásmico dependiente de una respuesta  $\sigma^E$ . GroEL permanece constante.

Expresamos las construcciones de los dominios transportadores en la cepa *E. coli* *UTdegP-P<sub>BAD</sub>::surA* y comprobamos que en el preinoculo con arabinosa (Figura 30, muestras indicadas con 0) se expresan y pliegan correctamente las construcciones derivadas de EhaA (HEA), ShdA (HES) e IgAP (HEI). Sin embargo, las construcciones derivadas de NalP (HEN) y BruA (HEBA) presentan un nivel alto de proteína desplegada (banda superior) (carriles 14 y 19, respectivamente), lo que puede ser debido a que en un mutante *degP* se acumulan precursores incorrectamente plegados y a la dependencia de HEBA de la ruta Skp/DegP.

Conforme realizamos en estos cultivos diluciones en medio con glucosa (condiciones I, II y III, Figura 30) todos los dominios transportadores muestran una acumulación de proteína en conformación desplegada (banda superior). Y en aquellos en los que la proteína plegada (banda inferior) se acumula en el preinoculo a menores concentraciones (HEI, HEN y HEBA) se puede observar una clara desaparición de la misma en la ME con las diluciones. En este ensayo vemos tanto la proteína de *síntesis de novo* como la proteína sintetizada previamente, y por ello, HEA (EhaA) y HES (ShdA) que se acumulan en gran cantidad en conformación plegada (banda inferior), se mantienen con las

## Resultados

diluciones. Observamos también que los cultivos que expresan las construcciones derivadas de EhaA (HEA), ShdA (HES) y BruA (HEBA) no crecen después de la segunda dilución, posiblemente por una mayor acumulación de proteína desplegada frente a la encontrada en las bacterias que expresan el AT de IgAP (HEI) o NalP (HEN). Se puede observar también un ligero aumento de la forma desplegada de OmpA en las diluciones con glucosa, mientras que GroEL no se ve afectada en ningún caso.



**Figura 30.** Expresión de los dominios transportadores en la cepa *E. coli* UTdegP-P<sub>BAD</sub>::surA.

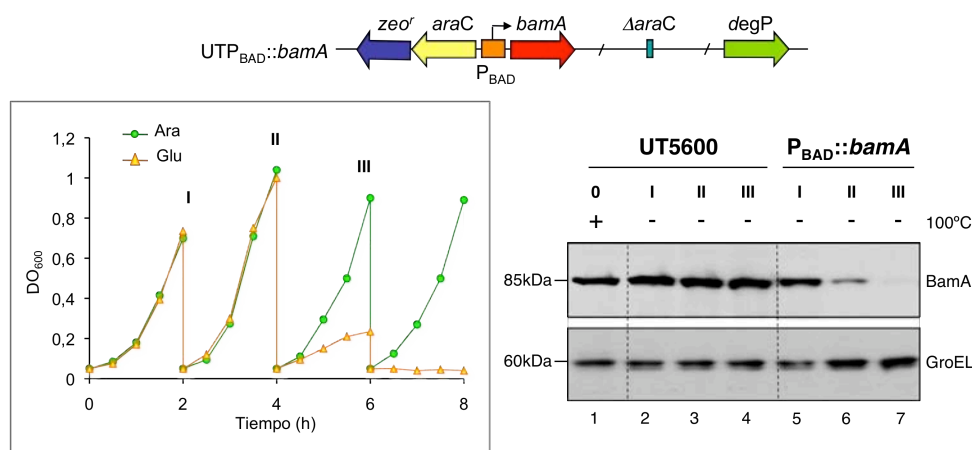
Western blot con anti-E-tag mAb-POD (panel superior), con anti-OmpA (panel intermedio) y con anti-GroEL mAb-POD (panel inferior). Nomenclatura: 0 es el preinoculo crecido en medio con arabinosa; I, II y III son los puntos en los que hemos tomado la muestra de los cultivos en medio con glucosa. Muestras hervidas (+) o no (-) según se indique.

Por lo tanto, todos los dominios transportadores analizados en la cepa *E. coli* UTdegP-P<sub>BAD</sub>::surA no son capaces de plegarse correctamente en ausencia de las dos rutas de las chaperonas periplásmicas (SurA y Skp/DegP).

### 2.3. Expresión de los dominios transportadores en un mutante condicional en *bamA*.

Decidimos analizar la dependencia del complejo Bam para la inserción de los dominios transportadores en un mutante condicional en *bamA* construido en la cepa *E. coli* UT5600 siguiendo la aproximación empleada para hacer el mutante condicional en SurA. La cepa empleada *E. coli* UTP<sub>BAD</sub>::bamA crece en medio con arabinosa, pero detiene su crecimiento en medio con glucosa después de la

tercera dilución cuando los niveles de BamA han caído drásticamente en la célula (Figura 31).



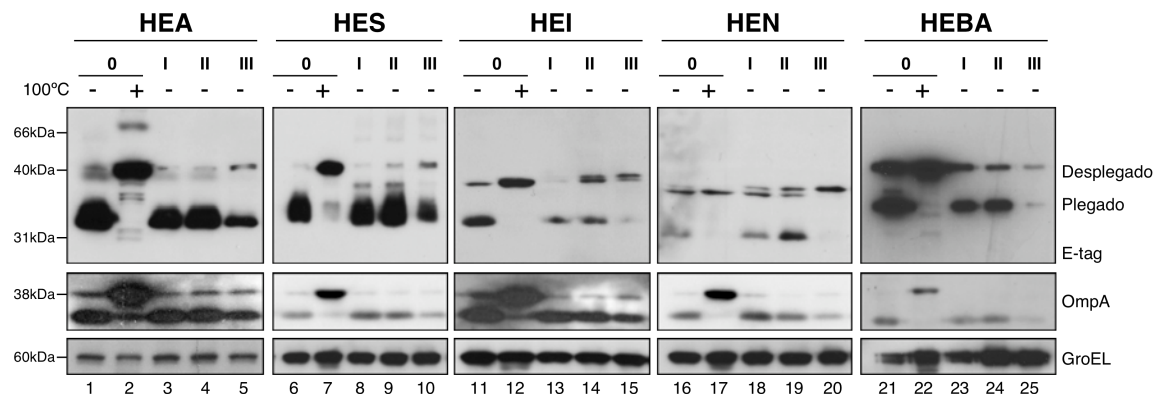
**Figura 31.** Análisis de la cepa *E. coli*  $UTP_{BAD}::bamA$ .

En la parte superior aparece la organización cromosómica del mutante y en la parte inferior la curva de crecimiento en presencia de arabinosa (círculos verdes) o glucosa (triángulos amarillos). En números romanos (I, II, III) se indica el punto en el que los cultivos son diluidos para mantener el crecimiento exponencial y en el que se toma la muestra a analizar en un *Western blot* en la inducción de las construcciones. El preinoculo, siempre con arabinosa se indica como 0. En el *Western blot* se aprecia la caída de BamA sólo en el mutante mientras que GroEL permanece constante en todos los casos.

Expresamos las construcciones de los dominios transportadores en la cepa *E. coli*  $UTP_{BAD}::bamA$ . Las construcciones se expresan correctamente en el preinoculo con arabinosa (indicado como 0, Figura 32), pero en medio con glucosa (condiciones I, II y III) todos los dominios transportadores son incapaces de plegarse correctamente.

La cantidad total de proteína transportadora disminuye claramente en todos los casos con las diluciones en medio con glucosa, al reducirse el nivel de BamA (Figura 32). También se aprecia una acumulación de la forma desplegada (banda superior) en las diluciones del cultivo con glucosa (carriles 5, 10, 15 y 20), especialmente evidente con las construcciones HEI (IgAP) y HEN (NaIP). HEBA (BruA) muestra una reducción drástica de sus niveles y no se observa una acumulación de proteína en conformación desplegada. La cantidad de OmpA con las diluciones también disminuye pero no se aprecia un aumento de la conformación desplegada mientras que GroEL no se ve afectada.

## Resultados



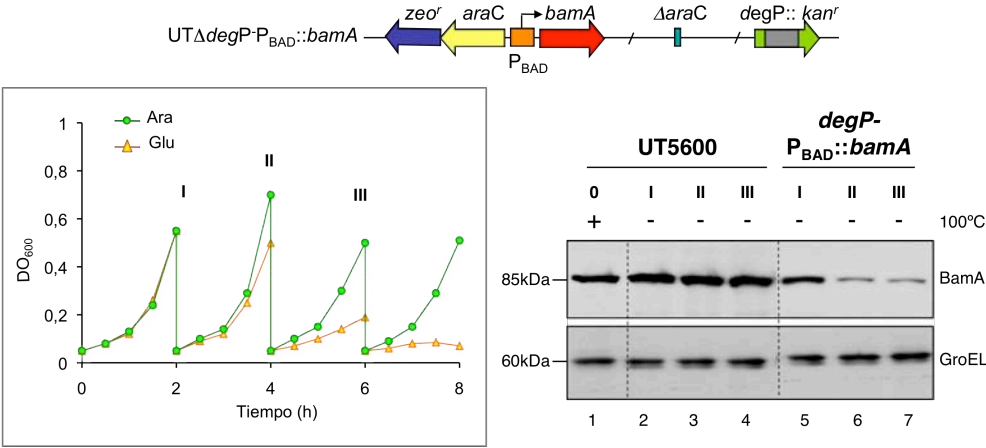
**Figura 32.** Expresión de los dominios transportadores en el mutante condicional para BamA.

Western blot con anti-E-tag mAb-POD (panel superior), con anti-OmpA (panel intermedio) y con anti-GroEL mAb-POD (panel inferior). Nomenclatura: 0 es el preinoculo crecido en medio con arabinosa; I, II y III son los puntos en los que hemos tomado la muestra de los cultivos en medio con glucosa. Muestras hervidas (+) o no (-) según se indique.

Por lo tanto, los dominios transportadores analizados dependen de BamA para su inserción en la ME, al no estar presente BamA disminuye la cantidad de proteína plegada y aumenta la proteína en conformación desplegada.

### 2.4. Expresión de los dominios transportadores en un mutante condicional en *bamA* y DegP.

Asimismo, realizamos la construcción de un mutante condicional *bamA* en un fondo genético con una mutación nula en *degP*. Esta cepa (*E. coli* UTdegP- $P_{BAD}::bamA$ ) crece en medio con arabinosa, pero en medio con glucosa presenta un retraso en el crecimiento a partir de la primera dilución y sufre una parada de crecimiento antes de la tercera dilución (Figura 33).

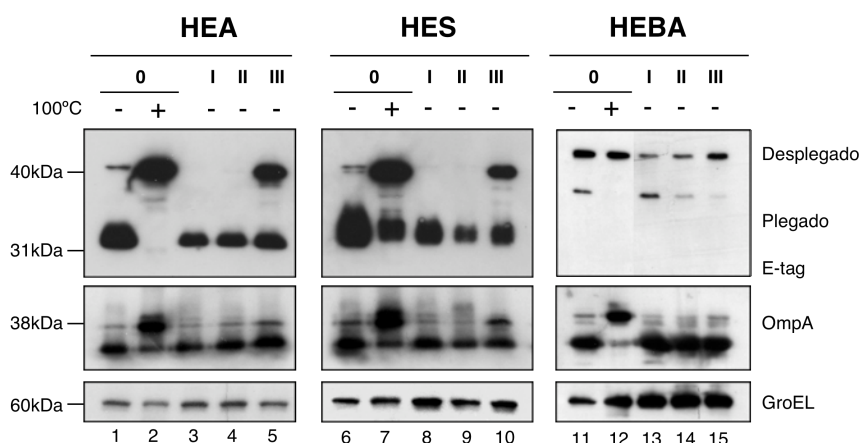


**Figura 33.** Análisis de la cepa *E. coli* UTdegP- $P_{BAD}::bamA$ .

En la parte superior aparece la organización cromosómica del mutante y en la parte inferior la curva de crecimiento en presencia de arabinosa (círculos verdes) o glucosa (triángulos amarillos). En números romanos (I, II, III) se indica el punto en el que los cultivos son diluidos para mantener el crecimiento exponencial y en el que se toma la muestra a analizar en un *Western blot* en la inducción de las construcciones. En el *Western blot* se aprecia la caída de BamA sólo en el mutante mientras que GroEL permanece constante en todos los casos.

En esta cepa realizamos la expresión de los dominios transportadores EhaA (HEA), ShdA (HES) y BruA (HEBA) ya que la forma desplegada de estas proteínas no se acumulaba claramente en la cepa *E. coli* UTP<sub>BAD</sub>::*bamA* (Figura 34).

En la cepa *E. coli* UTdegP-P<sub>BAD</sub>::*bamA* observamos claramente un aumento de la proteína desplegada en el punto III en presencia de glucosa, tanto para los dominios transportadores como para OmpA (carriles 5, 10 y 15, Figura 34). Sin embargo, la disminución de la proteína plegada es menos acusada a la observada en la cepa *E. coli* UTP<sub>BAD</sub>::*bamA*, posiblemente debido a que en ausencia de DegP la acumulación de precursores periplásmicos favorezca indirectamente su acumulación también en ME.



**Figura 34.** Expresión de los dominios transportadores en la cepa *E. coli* UTdegP-P<sub>BAD</sub>::*bamA*.

*Western blot* con anti-E-tag mAb-POD (panel superior), con anti-OmpA (panel intermedio) y con anti-GroEL mAb-POD (panel inferior). Nomenclatura: 0 es el preinoculo crecido en medio con arabinosa; I, II y III son los puntos en los que hemos tomado la muestra de los cultivos en medio con glucosa. Muestras hervidas (+) o no (-) según se indique.

Estos datos confirman que los dominios transportadores analizados se acumulan en conformación desplegada en el periplasma cuando los niveles de BamA en la célula son bajos y la proteasa DegP no esta presente para degradarlos rápidamente.



### 3. Búsqueda de nuevas proteínas implicadas en el proceso de autotransporte.

Hasta el momento habíamos realizado experimentos analizando proteínas con un papel conocido en la secreción de las proteínas de ME, aunque no había un estudio exhaustivo de su implicación en la secreción de los ATs. Decidimos realizar un estudio para intentar identificar nuevas proteínas que intervinieran en el plegamiento y/o inserción de los dominios transportadores de los ATs clásicos. Para ello creamos una genoteca de mutantes en *E. coli* UT5600 mediante inserción aleatoria en su genoma de un minitransposón. En esta genoteca expresamos la construcción Jun $\beta$  (esquema en la Figura 36), que expresa en la superficie de la bacteria la cremallera de leucinas (CL) de c-Jun fusionada al barril  $\beta$  de la IgAP y permite que el cultivo agregue, prueba de que está plegado correctamente el dominio transportador (Veiga et al., 2003a). La selección de esta construcción es debida a sus niveles intermedios de expresión, sobre los cuales sería más sencillo detectar diferencias de expresión que condujeran a una caída en la agregación del cultivo, aumentando así la sensibilidad de nuestro rastreo.

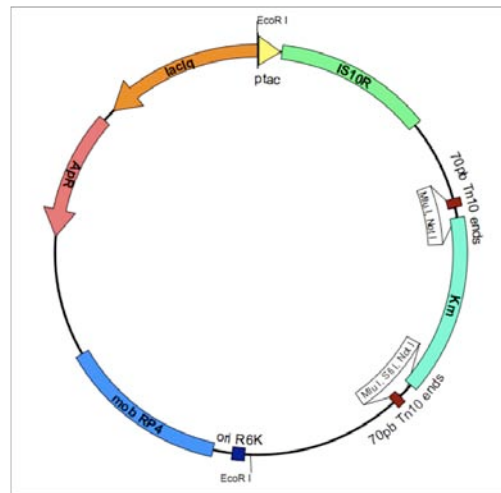
#### 3.1. Construcción de una genoteca de mutantes de transposición en el genoma de *E. coli*.

El genoma de *E. coli* K12 contiene ~4300 genes (Blattner et al., 1997; Dougan et al., 2001). De éstos, 4288 codifican proteínas, aunque el 38% tienen función desconocida. El resto de los genes codifican para RNAs estables. Por ello decidimos hacer una genoteca de mutantes de transposición de un tamaño aproximadamente 10 veces superior al número de genes que tiene *E. coli*.

Electroporamos la cepa *E. coli* UT5600 con el plásmido pLOF (Herrero et al., 1990) (Figura 35), que sólo es capaz de replicar en cepas que expresan la proteína  $\pi$  del plásmido R6K. El plásmido contiene un derivado del transposón Tn10 (miniTn10::Km) que se transpone al genoma al azar. Se seleccionaron las células kanamicina resistentes. El tamaño final de la genoteca obtenido fue de 40.000 clones Km<sup>r</sup>, de los cuales un 0,01% eran Ap<sup>r</sup> (debidos a la integración del



plásmido y del transposón). Hicimos electrocompetentes de la genoteca y las transformamos con pJun $\beta$  (Cm').



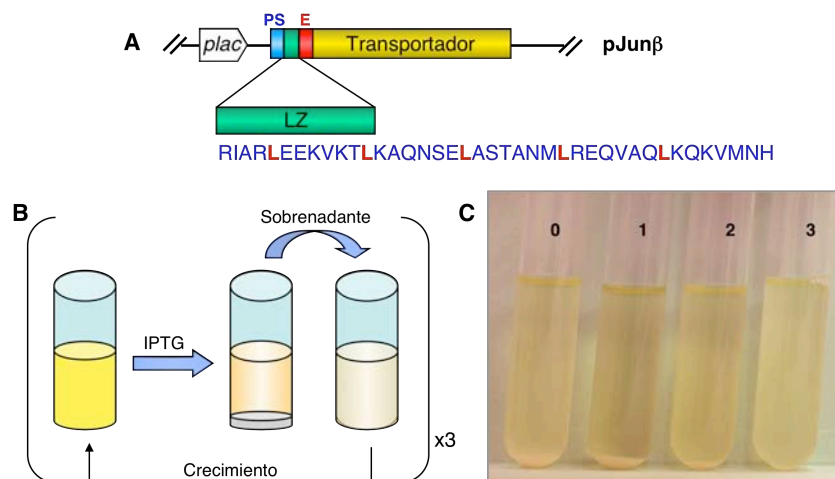
**Figura 35.** Esquema del plásmido pLOF-Km.

Se puede apreciar en el esquema el cassette de la kanamicina (Km) (azul claro), flanqueado por la regiones de 70 pb Tn10 terminales que permiten la recombinación (marrón). Se destacan: la región IS10R (verde), el promotor ptac (amarillo), la secuencia lacIq (naranja), el gen de resistencia a ampicilina (ApR) (rosa), la región de movilización RP4 (azul) y origen de replicación R6K (azul oscuro).

### 3.2. Rastreo de mutantes afectados en el proceso de autotransporte y su caracterización.

Llevamos a cabo rondas de crecimiento e inducción de la genoteca transformada con pJun $\beta$ , quedándonos siempre con el sobrenadante, es decir, las células que no son capaces de agregar y por tanto tienen afectada la capacidad de exponer en la superficie la CL.

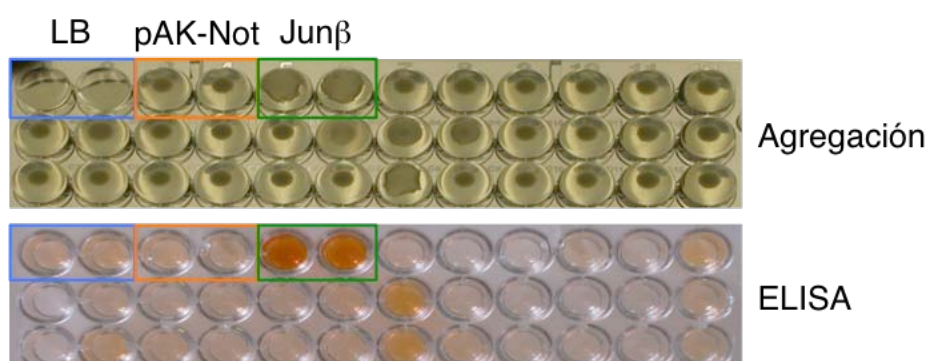
Realizamos tres rondas de crecimiento e inducción en tubos de ensayo. Se puede observar en la Figura 36 que al realizar las rondas de crecimiento e inducción el *pellet* de células que agrega es cada vez menor y la DO<sub>600</sub> del cultivo en suspensión aumenta.



**Figura 36.** Rondas de crecimiento e inducción de la genoteca miniTn10::Km transformada con pJunβ.

**A.** Esquema de la construcción pJunβ. **B.** Esquema del ensayo de crecimiento e inducción. **C.** Fotos de las rondas de agregación de la genoteca miniTn10::Km con pJunβ.

Analizamos 540 clones del último sobrenadante mediante ensayos de agregación en placas de 96 pocillos y ELISAs (de células intactas y permeabilizadas) con anti-E-tag mAb para detectar la exposición y expresión de Junβ. De estos clones un 11% agregó correctamente y presentaban buenos niveles de expresión en ELISA, por tanto los consideramos de fenotipo silvestre y no fueron estudiados posteriormente. Un 75% de los clones mostró una cinética de agregación más lenta que la observada para la cepa *wt*, pero los niveles de expresión de la proteína Junβ fueron iguales o incluso superiores a los obtenidos en la cepa *wt*, fueron denominados mutantes de Tipo 1. El 14% restante de los clones analizados no agregó en estos ensayos y expresaba niveles bajos o indetectables de Junβ en ELISA (Figura 37). Estos mutantes fueron denominados de Tipo 2.



**Figura 37.** Ensayo de agregación y ELISA de superficie de clones individuales de tipo 2.

Ensayo de agregación (panel superior) y ELISA de superficie con  $\alpha$ -E-tag-POD (panel inferior) de algunos clones de tipo 2. pAK-Not es el control negativo de agregación y pJun $\beta$  es el control positivo.

Confirmamos por *Western blot* los bajos niveles de expresión de Jun $\beta$  en los mutantes Tipo 2 y seleccionamos un grupo de 20 clones para su posterior estudio. Realizamos una cura de los plásmidos pJun $\beta$  presentes en estos mutantes para posteriormente retransformarlos con la preparación de plásmido original, con el objetivo de descartar mutaciones en el plásmido. Sin embargo, no conseguimos identificar ningún clon que, tras retransformación con el plásmido pJun $\beta$ , mantuviese el fenotipo mutante. Para confirmar este dato, identificamos el sitio de inserción del minitransposon en algunos de estos clones y, en paralelo, realizamos transducciones de sus mutaciones con el fago P1 a un fondo silvestre *E. coli* UT5600. De nuevo, la expresión de Jun $\beta$  en las cepas transducidas mostró un fenotipo silvestre. La mayoría de los genes identificados con la inserción del minitransposon en estos mutantes codifican proteínas de ME (Tabla 7), sugiriendo que su mutación puede generar un estrés adicional a la expresión de Jun $\beta$  en la envuelta celular que favorezca el crecimiento de aquellas bacterias con mutaciones en el plásmido.

**Tabla 7.** Punto de inserción en el genoma del miniTn10::Km de algunos mutantes Tipo 2.

Gen	Tamaño (aa)	GenBank	Función
yfbQ	405	g1788627	Desconocida. Posible aminotransferasa
yfdI / tfaS	443 / 96	g1788693 / g1788695	Desconocida. El mTn10-km está en la región intergénica (Zheng <i>et al.</i> , 2001)
yshA (ompL)	230	g1790307	Forma canales en la ME (Sardesai <i>et al.</i> , 2003)
yjhA (nanC)	238	g1790765	Próximo al operón fim e implicado en su regulación. Proteína de ME (Sohanpal <i>et al.</i> , 2004; Condemine <i>et al.</i> , 2005)
fimD	878	g1790772	Secreción y ensamblaje de las fimbrias tipo I. Proteína de ME (Remaut <i>et al.</i> , 2008; Nishiyama <i>et al.</i> , 2008)

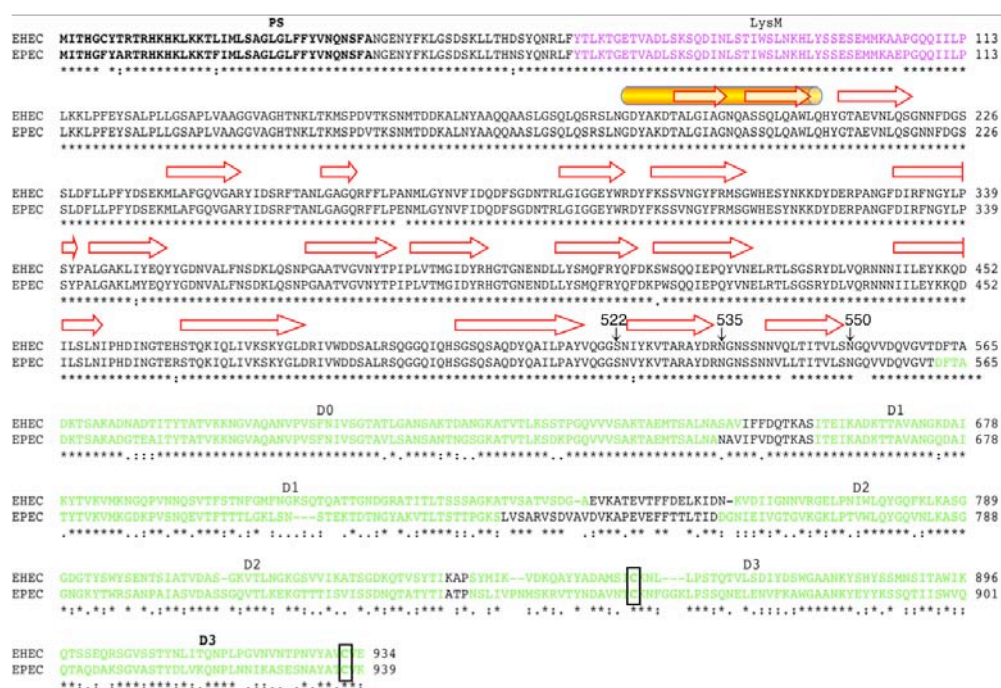
Por lo tanto, desafortunadamente, no conseguimos identificar nuevos genes implicados en el plegamiento y/o inserción de los ATs en la ME.

#### 4. Caracterización del dominio de transporte de Intimina y su relación estructura-función.

Intimina al igual que los ATs se caracteriza por poseer en un único polipéptido toda la información necesaria para la translocación a través de la MI y la ME, así como la expresión en la superficie de los dominios secretados. Por ello, pese a no ser un AT clásico, iniciamos un estudio para caracterizar la región mínima de Intimina con capacidad de transporte y su relación estructura-función.

##### 4.1. Estudio *in silico* del dominio transportador de Intimina.

Realizamos una predicción de estructura secundaria para Intimina de EHEC (*E. coli* O157:H7 EDL933) y de EPEC (*E. coli* 2348/69), que emplearemos más adelante, de 934 y 939 aminoácidos respectivamente (Figura 38).



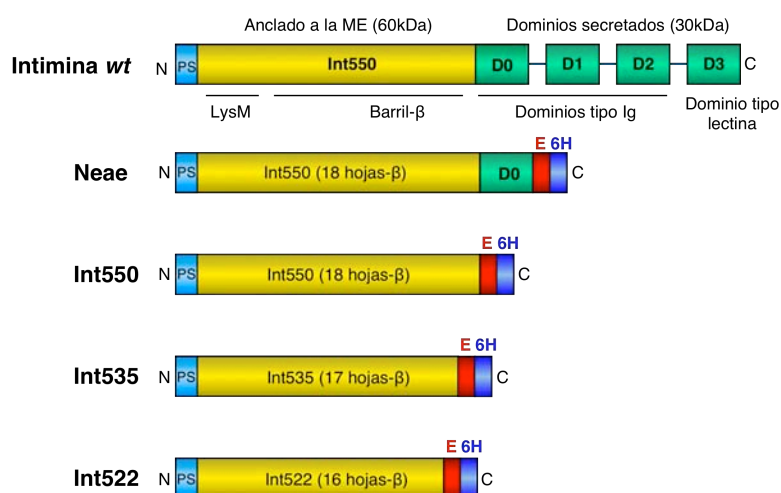
**Figura 38.** Predicción de estructura secundaria de Intimina de EHEC y EPEC.

Intiminas de EHEC O157:H7 (GenBank AAG58823) y EPEC 2348/69 (GenBank YP\_002331401). En negrita se marca el péptido señal y en morado el dominio LysM. El cilindro amarillo indica la predicción de hélice  $\alpha$  con PSI-pred (Jones, 1999), con flechas rojas indicamos la predicción de hojas  $\beta$  transmembrana anfipáticas (PRED-TMBB (Bagos et al., 2004) y ProfTMB (Bigelow et al., 2004)) y en verde los dominios secretados D0, D1, D2 y D3. Las cisteínas del dominio D3 se han recuadrado en negro. Con flechas negras se marca el último aminoácido del dominio transportador de las construcciones Int522, Int535 e Int550. Las dos secuencias se apilaron con el programa tcoffee (Larkin et al., 2007), dando un % de identidad en el apilamiento: (\*) 100% identidad, (:) >60% de similitud y (.) >40% de similitud.

Ambas secuencias son 83% idénticas y si sólo consideramos los 550 primeros aa (dominio transportador) son 98% idénticas. En ninguna se predice una hélice  $\alpha$  entre el dominio transportador y los dominios secretados empleando el mismo algoritmo (PSI-Pred) utilizado en el caso de los ATs clásicos. La única hélice  $\alpha$  que se predice aparece en el dominio periplásmico a continuación del dominio LysM implicado en la unión al PG (Buist et al., 2008) (Figura 38). Se predicen 16 hojas  $\beta$  anfipáticas entre los residuos 210 y 550. Además, aparecen con menor probabilidad dos posibles hojas  $\beta$  anfipáticas adicionales solapando con la predicción de la hélice  $\alpha$  posterior al dominio LysM.

#### 4.2. Plegamiento del dominio transportador de Intimina.

Seleccionamos el gen *eaeA* de *E. coli* O157:H7 (EHEC) para amplificar el dominio transportador de Intimina. Quisimos determinar la región mínima con capacidad de transporte y para ello realizamos varias construcciones del dominio transportador de Intimina (región N) fusionado a un epítipo E y un epítipo de 6 histidinas en el extremo C-terminal (Figura 39). Las construcciones llevan el péptido señal (PS) de Intimina.



**Figura 39.** Estructura modular de Intimina completa y esquema de las construcciones.

En azul claro aparece el PS, en amarillo el dominio transportador, en verde los dominios pasajeros, en rojo el epítipo E y en azul oscuro el polipéptido de 6 histidinas.

La construcción Int550 corresponde a los 550 primeros aa de Intimina. En trabajos anteriores, una construcción equivalente de EPEC tenía propiedades de

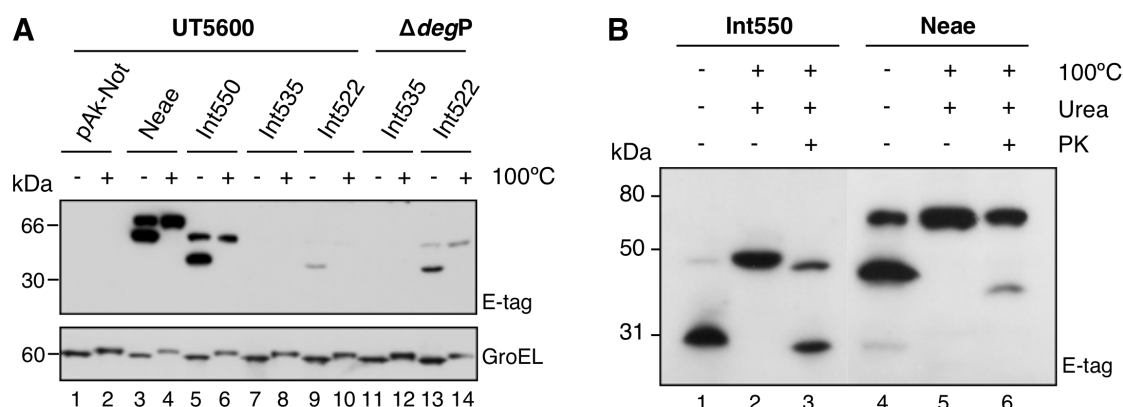
barril  $\beta$  y localizaba en la ME aunque no se detectaba la formación de un poro hidrofílico *in vitro* (Touze et al., 2004). No hay trabajos que delimiten el barril  $\beta$  mínimo de Int550 o que demuestren si este polipéptido es suficiente para translocar péptidos a la superficie de la bacteria. Realizamos otras dos construcciones, Int535 e Int522, que corresponden a los 535 y 522 primeros aa de Intimina respectivamente, para acortar una o dos hojas  $\beta$  el dominio transportador y analizar la capacidad de autotransporte de cada una de ellas (ver Figura 38). Hicimos una cuarta construcción, Neae, que corresponde con los 659 primeros aa de Intimina (Int550 y el dominio D0) y de la que se ha descrito su capacidad de transportar diferentes péptidos y proteínas a la superficie de las bacterias (Wentzel et al., 2001).

Empleamos la cepa de *E. coli* UT5600 para expresar las construcciones derivadas del dominio transportador de Intimina, la misma que empleamos para la expresión de las construcciones derivadas de los ATs. La expresión de estas proteínas de fusión está controlada por el promotor del operón *lac* de *E. coli* (*Plac*) y se inducen añadiendo IPTG al medio de cultivo.

Llevamos a cabo la inducción de los cultivos en las mismas condiciones empleadas con los ATs y a continuación realizamos el ensayo de cambio de movilidad para chequear el correcto plegamiento de las construcciones (Figura 40A). Para apreciar correctamente el cambio de movilidad en Intimina es necesario hervir durante 30 min las muestras en un tampón con 4M urea y 2% SDS. Sólo las construcciones con la predicción del barril  $\beta$  completo se expresan a niveles altos, Neae e Int550 (carriles 3-6), mientras que las delecciones de la predicción del barril  $\beta$  no se detectan (carriles 7-10). Probamos a expresar las delecciones en un mutante *degP* para tratar de mejorar la expresión de éstas construcciones (carriles 11-14), ya que en ésta cepa la degradación de intermedios periplásmicos está reducida. Conseguimos detectar a niveles bajos la delección Int522 observándose el cambio de movilidad, pero nunca en el caso de Int535. La mayor estabilidad de Int522 podría deberse a que tiene como las proteínas de ME naturales un número par de hojas  $\beta$  (14 o 16 dependiendo de si



se tienen en cuenta las dos hojas que solapan con la predicción de la hélice  $\alpha$ ). Por el contrario Int535 tendría un número impar de hojas  $\beta$  (15 o 17 según qué predicción consideremos).



**Figura 40.** Expresión de las construcciones derivadas de Intimina: Neae, Int550, Int535 e Int522.

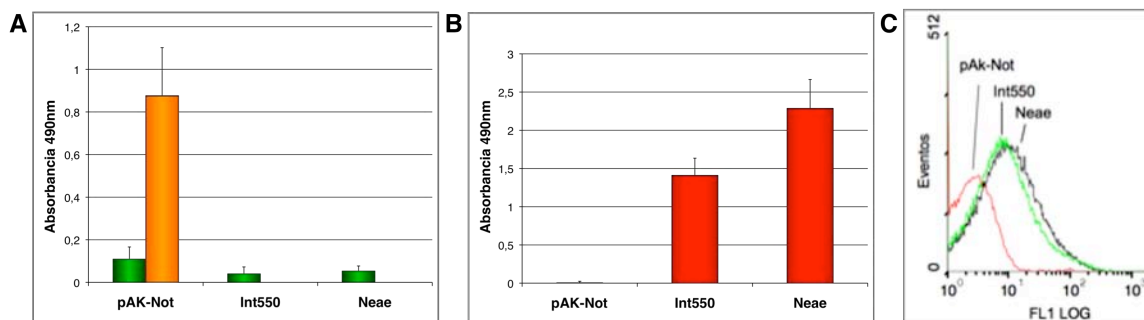
**A.** Western blot con anti-E-tag mAb-POD para analizar el cambio de movilidad de las construcciones (panel superior). En los carriles 1-2 y 7-14 se ha cargado el doble de volumen que en los carriles 3-6, para permitir la detección de Int552, lo que se puede apreciar en el Western blot con anti-GroEL mAb-POD empleado como control de carga (panel inferior). **B.** Cambio de movilidad y ensayo de degradación con proteinasa K (PK) de bacterias expresando Int550 y Neae, según se indica. Western blot revelado con anti-E-tag mAb-POD.

Realizamos un ensayo de degradación con proteasas en bacterias que expresan las construcciones Int550 y Neae para determinar la exposición de los epítomos en la superficie (Figura 40B). En ambos casos observamos una degradación parcial con proteinasa K (PK) y una ausencia de degradación con tripsina (datos no mostrados). Esto podría indicar una falta de exposición de las proteínas o una resistencia a la degradación con proteasas.

Para comprobar que los epítomos están expuestos en la superficie de la célula hicimos un ELISA con células intactas con un anticuerpo contra el epítomo E (Figura 41A) y contra el PG para determinar la permeabilidad de la ME (Figura 41B). También realizamos un ensayo de citometría de flujo con anti-E-tag mAb (Figura 41C). Pudimos comprobar que los epítomos están correctamente expuestos en la superficie de la célula y que la expresión de estas construcciones no altera la permeabilidad de la ME, pues la señal con el anti-PG es similar al vector vacío (pAK-Not) y muy inferior al control de lisis. El resultado

## Resultados

en el ensayo de citometría de flujo coincide con el del ELISA, Intimina da un pico de fluorescencia claramente superior al del control negativo (pAK-Not). Si bien los niveles de fluorescencia son menores a los obtenidos con las construcciones de los ATs.



**Figura 41.** Análisis del grado de exposición en superficie del epítipo E de las construcciones derivadas de Intimina Int550 y Neae.

**A.** ELISA de superficie de células intactas con anti-PG para determinar la accesibilidad del peptidoglicano (PG) (verde). El control de lisis es el cultivo de *E. coli* con el vector vacío (pAK-Not) en tampón suplementado con 10 mM de EDTA y sonificado (naranja). **B.** ELISA de células intactas con anti-E-tag mAb-POD. **C.** Ensayo de citometría de flujo con anti-E-tag mAb y empleando como secundario anti-ratón conjugado con Alexa-488.

Estos datos nos permiten afirmar que los fragmentos derivados de Intimina, Neae e Int550, se expresan correctamente y son capaces de exponer en la superficie de la célula los epítipos. Las construcciones con regiones menores a Int550 son inestables y no funcionales en transporte.

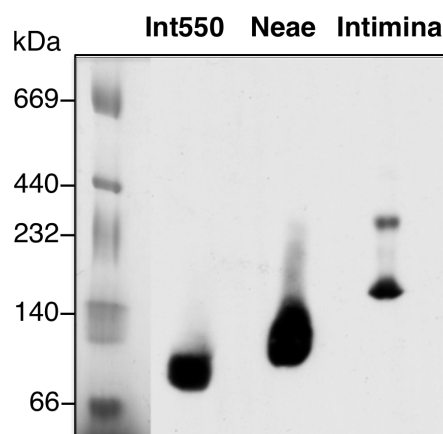
### 4.3. Estructura cuaternaria.

Se había descrito que Int550 forma dímeros en filtración en gel y mediante *cross-linking in vitro*, pero no forma estructuras oligoméricas en microscopía electrónica (Touze et al., 2004). El mismo trabajo también había descrito que Intimina completa produce dímeros en filtración en gel y estructuras en forma de anillo visibles por microscopía electrónica (Touze et al., 2004).

Decidimos emplear la tecnología del BN-PAGE para estudiar la estructura cuaternaria de Intimina, y los polipéptidos truncados Int550 y Neae. En este caso empleamos para el BN-PAGE un extracto de las proteínas de ME de la cepa EPEC 2348/69 (que expresa constitutivamente Intimina) y de la cepa UT5600 en



la que habíamos inducido las construcciones Int550 y Neae. Al realizar un *Western blot* del gel BN-PAGE con anticuerpos específicos (Figura 42) pudimos observar que las construcciones Int550 y Neae aparecen como homodímeros principalmente, y que Intimina completa (EPEC) aparece como un dímero fundamentalmente (banda inferior) y minoritariamente en la parte superior se aprecia una banda que puede corresponder a un tetrámero (masa ~350 kDa) (Figura 42).



**Figura 42.** Determinación de la estructura cuaternaria de Intimina en la membrana externa mediante BN-PAGE.

*Western blot* de las construcciones Int550, Neae e Intimina completa purificadas de membrana externa y separadas mediante BN-PAGE. Int550 y Neae de EHEC están reveladas con anti-E-tag mAb-POD e Intimina completa expresada constitutivamente por *E. coli* 2348/69 con anti-Int280 y proteína A-POD.

Según estos datos la estructura cuaternaria del dominio transportador de Intimina es un dímero y es necesaria la expresión de la proteína completa (incluido el pasajero) para apreciar la formación de estructuras oligoméricas superiores.

En colaboración con el Dr. Gustavo Bodelón he llevado a cabo en el laboratorio un estudio del papel de las chaperonas periplásmicas y del complejo Bam en la secreción y plegamiento de Intimina (Bodelon et al., 2009) (ver Anexo I). La conclusión de este trabajo es que Intimina emplea preferentemente la ruta de SurA, frente a la ruta Skp/DegP que utiliza sólo de forma minoritaria. Dicho resultado se obtiene tanto con la Intimina completa como con la construcción Int550 (ver Figura 39). Al igual que los autotransportadores comprobamos que la

## Resultados

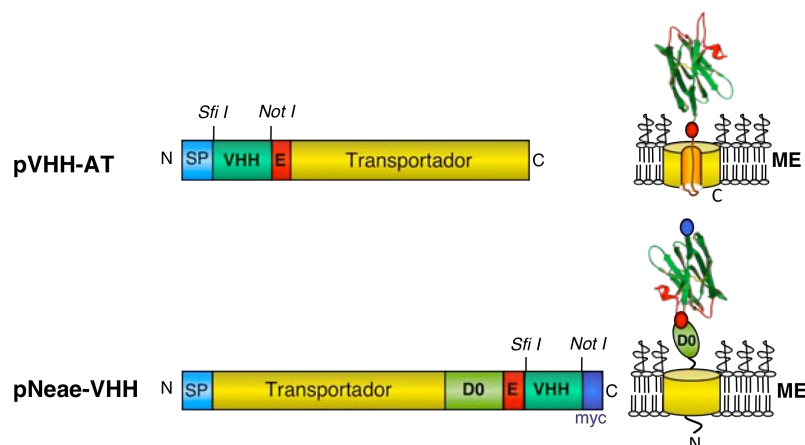
inserción en la ME de Intimina requiere la presencia de la proteína BamA. Por último, también demostramos un papel principal de DegP en la degradación de Intimina que se acumula en el periplasma en ausencia de BamA. Por lo tanto, Intimina es similar a los autotransportadores clásicos tanto por la formación de dímeros en ME y como por el requerimiento de chaperonas para su transporte por el periplasma e inserción en la ME (p. Ej. SurA o BamA). Como aspectos diferenciales es remarcable la extraordinaria estabilidad a la desnaturalización y resistencia a la proteólisis del barril  $\beta$  de Intimina, así como la ausencia de una hélice  $\alpha$  que conecte directamente este barril  $\beta$  con los dominios secretados C-terminales.

## 5. Aplicaciones biotecnológicas de los SST5 en la selección de anticuerpos recombinantes presentados en la superficie de *E. coli* (*bacterial display*).

Los dominios de los SST5 con capacidad de transporte a través de la ME pueden ser empleados como dominios de transporte y anclaje de péptidos y proteínas a la superficie de la bacteria. Esta presentación heteróloga de péptidos y proteínas en bacterias (*bacterial display*) puede ser especialmente útil para la selección desde genotecas de anticuerpos recombinantes de clones de alta afinidad y especificidad frente a un antígeno determinado.

### 5.1. Exposición en la superficie bacteriana de *Nanobodies* fusionados a dominios de autotransporte e Intimina.

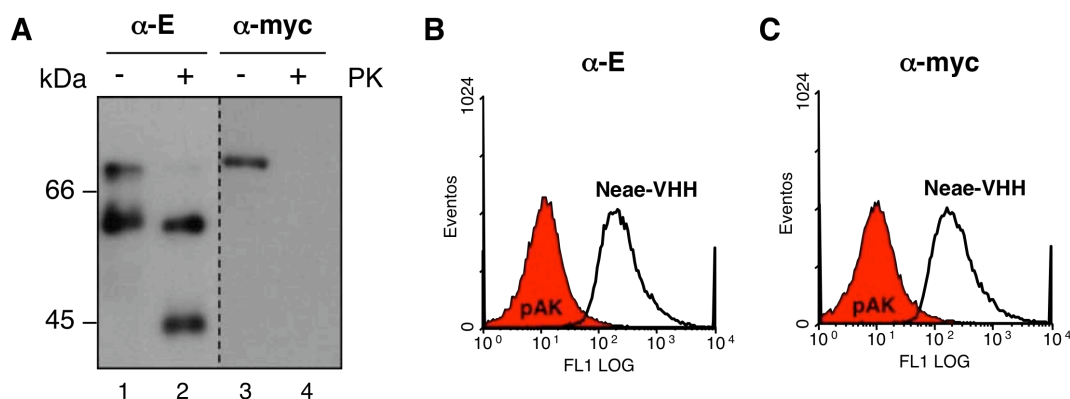
Para demostrar la capacidad de los dominios transportadores de SST5 de anclar correctamente anticuerpos recombinantes en la superficie de *E. coli*, realizamos diferentes construcciones empleando un *Nanobody* ( $V_{HH}$ ) modelo frente al fibrinógeno humano fusionado a los dominios transportadores de Intimina y de los ATs EhaA, ShdA, IgAP, NalP y BruA. Para los dominios ATs, en todos los casos fusionamos el *Nanobody* directamente a los dominios mínimos con hélice  $\alpha$  empleados anteriormente para el *display* de péptidos (His-tag y CL de c-Jun). En el caso de Intimina realizamos construcciones a Neae e Int550 observando un mayor nivel de expresión y estabilidad con Neae (datos no mostrados). En la Figura 43 se observan las diferencias entre las construcciones con los dominios de los ATs y Neae, pues el *Nanobody* queda anclado a la región C-terminal de los ATs y a la N-terminal de Neae. Ésto conlleva una orientación opuesta del *Nanobody* en la superficie de la célula que podría modificar su capacidad de unión al antígeno.



**Figura 43.** Esquema de las construcciones con un *Nanobody* fusionado al dominio transportador de un autotransportador o al dominio Neae de Intimina.

En azul claro aparece el péptido señal (PS), en verde el *Nanobody* (VHH) flanqueado por los sitios de corte de enzimas de restricción (*Sfi*I y *Not*I), en rojo el epítipo E y en amarillo el dominio transportador. En la construcción de Intimina en verde claro se muestra el dominio D0 y en azul oscuro el epítipo myc. Abreviaturas: N, amino terminal; C, carboxi terminal; ME, membrana externa.

La construcción con el dominio Neae de Intimina (Neae-VHH) lleva, además del epítipo E anterior al *Nanobody*, un epítipo myc en el extremo C-terminal. La detección de ambos epítipos en la superficie de la bacteria nos asegura que el *Nanobody* está completamente expuesto en la superficie de la bacteria. Comprobamos que ambos epítipos (E y myc) están en la superficie de la célula mediante un ensayo de degradación con proteinasa K (PK) (Figura 44A) y citometría de flujo (Figura 44B y 44C). También realizamos un ensayo de inmunofluorescencia con los dos anticuerpos y obtuvimos el mismo resultado (resultados no mostrados).

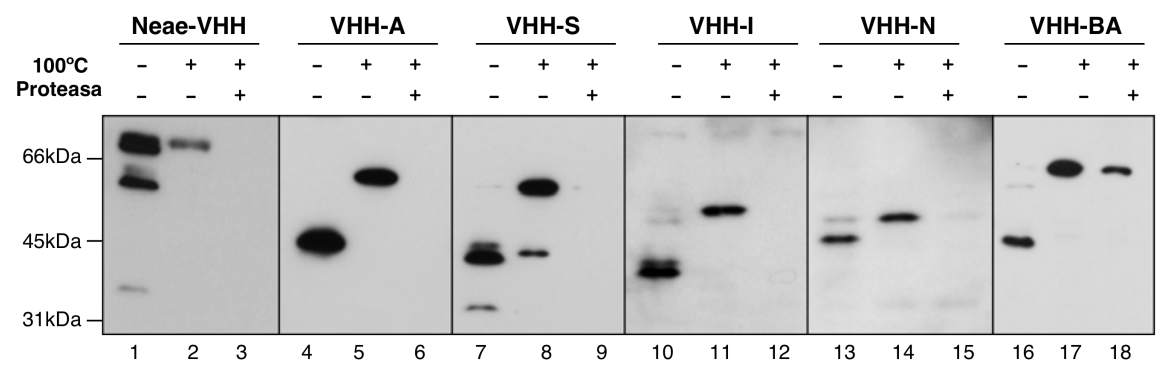


**Figura 44.** Expresión de la construcción Neae-VHH en la superficie de *E. coli*.

**A.** Ensayo de degradación con proteinasa K (PK) de Neae-VHH. Western blot con anti-E-tag mAb en el que se observa una banda de resistencia que corresponde al dominio transportador y una banda de

degradación de la construcción de menor tamaño (carril 2), mientras que con anti-myc mAb el epítipo se degrada completamente y no se observan bandas en el carril de degradación con proteínasa K (carril 4). **B.** Ensayo de citometría de flujo con anti-E-tag mAb. **C.** Ensayo de citometría de flujo con anti-myc mAb.

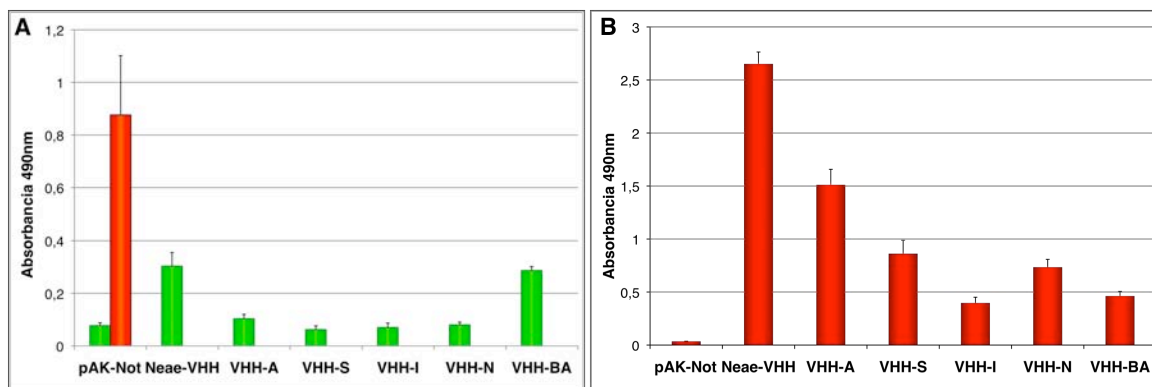
Expresamos las construcciones de un *Nanobody* fusionado a Intimina y los dominios transportadores en *E. coli* UT5600 y realizamos un ensayo de cambio de movilidad y degradación con tripsina en el caso de las construcciones derivadas de los ATs y en el caso de Intimina usamos el tampón con urea y como proteasa la proteínasa K (Figura 45). En todas las construcciones se observa el cambio de movilidad correctamente, las proteínas están bien plegadas y se insertan en la ME. La degradación con las proteasas de los dominios expuestos es completa, excepto en el caso de la construcción con el dominio transportador de *B. abortus*, que se degrada parcialmente. Las construcciones derivadas de la IgAP y de NaIP, son las que presentan un menor nivel de expresión (el *Western blot* está más expuesto en estos dos casos). La construcción con el dominio transportador de Intimina está perfectamente expuesta en la superficie de la bacteria y por ello se degrada completamente con la PK.



**Figura 45.** Expresión de las construcciones con un *Nanobody* fusionado a los dominios transportadores de los autotransportadores y de Intimina.

*Western blot* con anti-E-tag mAb para las construcciones derivadas de los ATs y con anti-C-myc para la construcción derivada de Intimina.

Realizamos un ELISA con anti-PG y anti-E-tag mAb para comprobar la permeabilidad de la ME y el nivel de exposición de los pasajeros en la superficie de las bacterias con las distintas construcciones (Figura 46).



**Figura 46.** ELISA de superficie de las construcciones con un VHH fusionado al dominio transportador de los autotransportadores e Intimina.

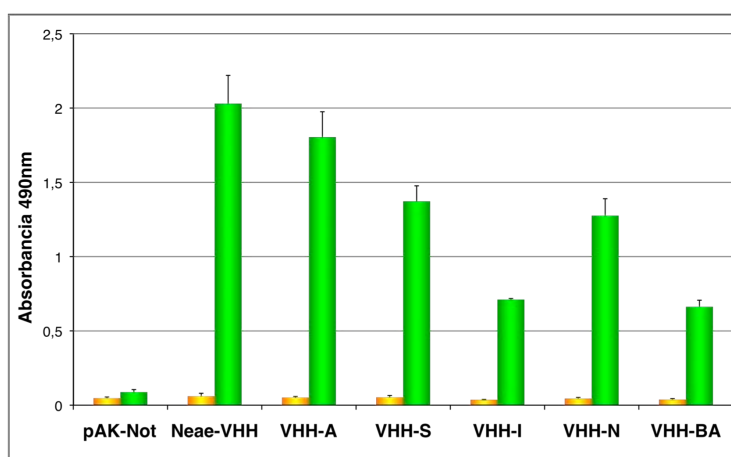
**A.** ELISA de superficie de células intactas con anti-PG para determinar la accesibilidad del peptidoglicano (PG) (verde). El control de lisis es el cultivo de *E. coli* con el vector vacío (pAK-Not) en tampón suplementado con 10 mM de EDTA y sonificado (naranja). **B.** ELISA de células intactas con anti-E-tag mAb-POD.

La expresión de las construcciones en *E. coli* UT5600 no altera la permeabilidad de la ME. El nivel de accesibilidad del PG es similar al vector vacío (pAK-Not), excepto para las construcciones derivadas de Intimina y del dominio transportador de *B. abortus* (VHH-BA) que es ligeramente superior (Figura 46A). Intimina (Neae-VHH) presenta el nivel más alto de exposición en la ME del *Nanobody*, seguido de la construcción con el dominio transportador de EhaA (VHH-A) (Figura 46B). Las construcciones derivadas de ShdA (VHH-S), IgAP (VHH-I), NaIP (VHH-N) y BruA (VHH-BA) tienen menor nivel de exposición del epítipo E en el ELISA (Figura 46B). Los datos coinciden con las diferencias de expresión observadas por *Western blot* (ver Figura 45).

## 5.2. Plegamiento y capacidad de unión al antígeno de los *Nanobodies* presentados en la superficie de *E. coli*.

Los resultados anteriores demuestran la exposición en la superficie de la bacteria de las fusiones de un *Nanobody* a Intimina y a los dominios transportadores. Para averiguar si son capaces de reconocer su antígeno específicamente, realizamos un ensayo de unión al antígeno mediante ELISA sobre placas recubiertas con el antígeno específico reconocido por el *Nanobody* (fibrinógeno humano) o con un antígeno control (BSA). Añadimos las bacterias expresando el *Nanobody* en la superficie directamente sobre las placas de ELISA y detectamos la unión con anti-E-tag mAb (ver Materiales y Métodos). En base a

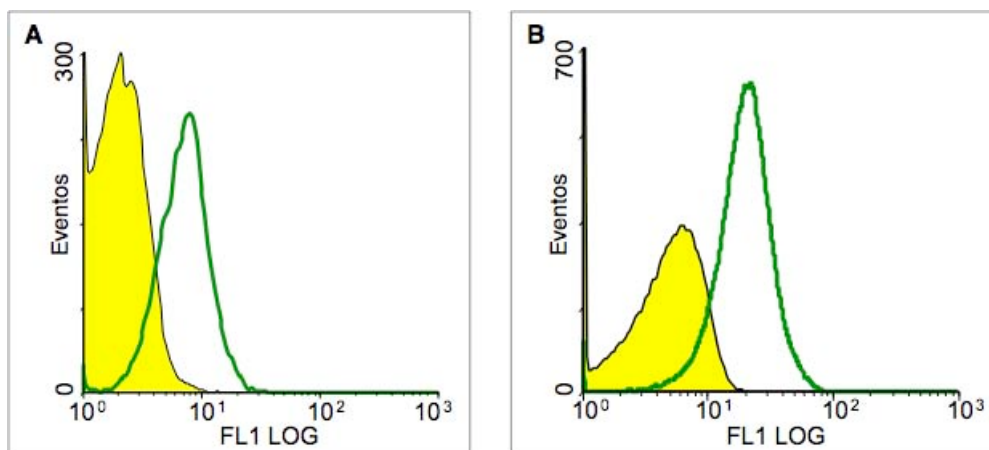
este ensayo podemos confirmar la unión del *Nanobody* a su antígeno específico, el fibrinógeno (Figura 47) y comprobamos una correlación de los niveles de unión con el nivel de proteína expuesto en la superficie de la bacteria (Figuras 45-46).



**Figura 47.** Ensayo de unión mediante ELISA de un VHH fusionado a los dominios transportadores e Intimina.

Las placas de ELISA están recubiertas con antígeno control (BSA) (amarillo) o antígeno positivo (fibrinógeno) (verde). El *Nanobody* (VHH) con afinidad por fibrinógeno fusionado a los dominios transportadores de los ATs e Intimina es capaz de unir específicamente fibrinógeno y no se une a la BSA (antígeno control).

Los niveles más altos se obtienen con las fusiones al dominio transportador de Intimina (Neae-VHH) y EhaA (VHH-A), con las que realizamos ensayos de unión al antígeno mediante citometría de flujo empleando los antígenos marcados con fluoresceína (FITC) (Figura 48). Ello nos permite marcar las células que unen el antígeno específicamente y con ello conocer el estado de toda la población. Se observa un claro desplazamiento del histograma en los ensayos en los que el *Nanobody* fusionado al dominio transportador se enfrenta al fibrinógeno-FITC con respecto al antígeno control (BSA-FITC). La unión es específica, tanto si el *Nanobody* está fusionado al dominio transportador de EhaA como si está fusionado al de Intimina.



**Figura 48.** Ensayo de unión al antígeno mediante un ensayo de citometría de flujo.

Histograma de la señal de fluorescencia de un cultivo de *E. coli* UT5600 expresando en su superficie un *Nanobody* frente al fibrinógeno humano fusionado al dominio transportador de EhaA (VHH-A) **(A)** o al dominio transportador de Intimina (Neae-VHH) **(B)**. Los antígenos (fibrinógeno y BSA) están marcados con fluoresceína (FITC). La señal obtenida con el antígeno control (BSA-FITC) se indica en amarillo y con el antígeno positivo (fibrinógeno-FITC) en verde.

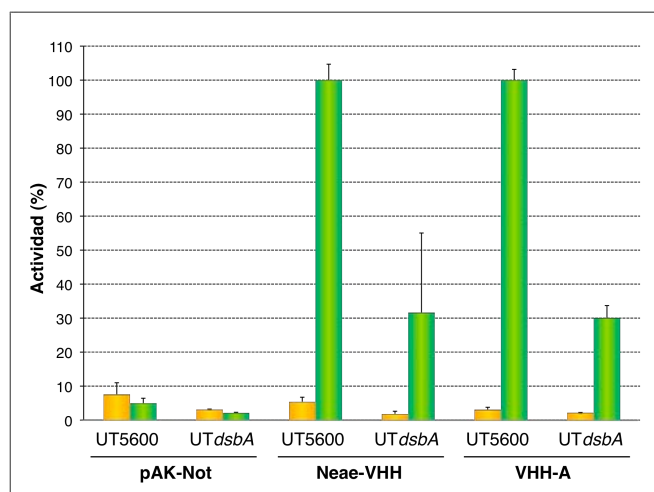
Este resultado es importante si queremos emplear el FACS-sorter (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) para seleccionar *Nanobodies* frente a antígenos específicos dentro de una genoteca, donde los *Nanobodies* se encuentran fusionados a los dominios transportadores estudiados.

### 5.3. Influencia de la formación del puente disulfuro en la actividad de los *Nanobodies* presentados en la superficie bacteriana.

Los *Nanobodies* tienen al menos un puente disulfuro intradominio conservado en su estructura. En los dominios Ig de los anticuerpos convencionales la formación de este puente disulfuro conservado es muy importante para la estabilidad de su estructura terciaria y por tanto para su actividad de unión al antígeno. Quisimos comprobar cuál era la influencia de la formación de este puente disulfuro en la actividad de unión de los *Nanobodies* presentados en la superficie de la bacteria por los dominios de transporte de EhaA e Intimina. Para ello comparamos la actividad de unión de las construcciones VHH-A y Neae-VHH en cepas *wt* y mutantes *dsbA* mediante un ensayo de ELISA (Figura 49). DsbA es la principal enzima catalizadora de la formación del puente disulfuro en el periplasma y, por lo tanto, en un mutante *dsbA* no se forma el puente disulfuro conservado en los dominios Ig durante su paso por el periplasma (Jurado et al., 2002). En trabajos previos en el laboratorio se había observado que la expresión de la construcción



Vamyβ, que contiene un *Nanobody* frente a α-amilasa fusionado a un fragmento C-terminal de la IgAP de 45 kDa (C-IgAP), reduce drásticamente su actividad en la cepa mutante *dsbA* (Veiga et al., 2004).



**Figura 49.** Papel de la DsbA en la unión a su antígeno del VHH fusionado al dominio transportador de EhaA (VHH-A) e Intimina (Neae-VHH).

Ensayo de ELISA para determinar la unión al antígeno de los *Nanobodies* presentados en la superficie de la cepas *E. coli* UT5600 (*wt*) y su isogénica  $\Delta dsbA$  (UT*dsbA*). Se muestran los datos obtenidos con las construcciones Neae-VHH y VHH-A. El *Nanobody* (VHH) reconoce específicamente fibrinógeno humano. Como control, se muestra el dato de la unión de las mismas cepas con el vector vacío (pAK-Not). Las placas de ELISA se recubrieron con el antígeno positivo (fibrinógeno) (barras verdes) y con antígeno control (BSA) (barras amarillas), para ambas cepas.

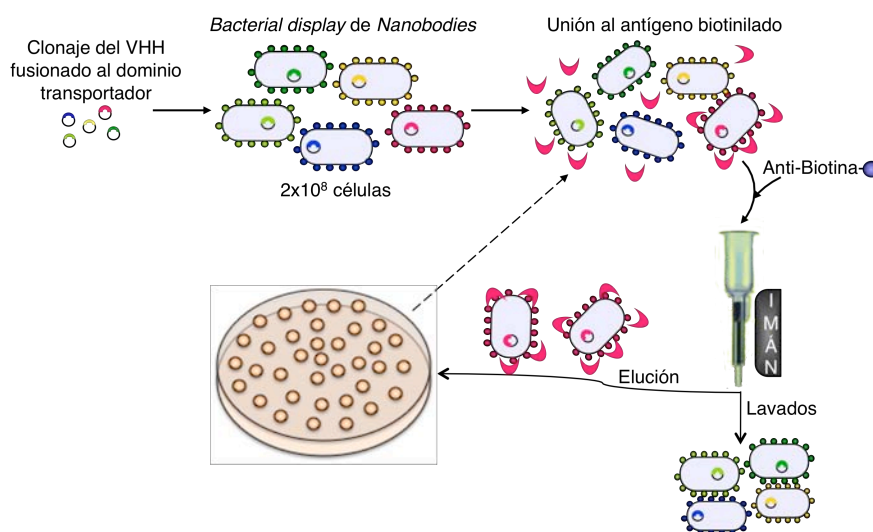
Como se muestra en la Figura 49, observamos una reducción clara en la actividad de unión al antígeno del *Nanobody* presentado en la cepa mutante *dsbA* tanto con el dominio EhaA (VHH-A) como con el de Intimina (Neae-VHH). Confirmamos mediante *Western blot* que el nivel de expresión de estas construcciones en ambas cepas es idéntico (resultados no mostrados). Por lo tanto un nivel óptimo de actividad del *Nanobody* requiere de la presencia de DsbA en la bacteria.

#### 5.4. Aplicación del MACS para la selección de *Nanobodies* en la superficie de *E. coli*.

La presentación eficiente en la superficie de *E. coli* de *Nanobodies* empleando ATs o Intimina abre la posibilidad de desarrollar un sistema de selección de clones específicos frente a un antígeno concreto. Por ello resulta interesante la puesta a punto de las condiciones experimentales que permitan dicha selección.

## Resultados

Con este fin llevamos a cabo una serie de experimentos piloto para averiguar si es posible recuperar *Nanobodies* con una especificidad concreta incubando las bacterias que los expresan en su superficie con el antígeno marcado. En la Figura 48 ya pudimos observar como era posible discriminar mediante citometría de flujo, con un antígeno marcado con fluoresceína, una población bacteriana que expresa en su superficie el *Nanobody* específico frente al antígeno. Este hecho sugiere que sería posible emplear un FACS-sorter (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) para el enriquecimiento de la población positiva en fluorescencia y que por tanto, contiene clones que son capaces de unir el antígeno. Sin embargo, la maquinaria requerida para estos experimentos es compleja y cara, y requiere la utilización de personal técnico especializado. Por ello, buscamos una técnica alternativa más sencilla y con potencial de desarrollo dentro de un laboratorio convencional. Decidimos emplear la tecnología MACS (*Magnetic cell sorting*) que permite recuperar de mezclas celulares complejas determinadas subpoblaciones marcándolas con anticuerpos que reconocen moléculas de su superficie. Estos anticuerpos son después unidos por otros anticuerpos secundarios que están modificados con microesferas de 50 nm de material superparamagnético que se capturan con un imán de gran potencia. Empleamos como modelo las construcciones VHH-A (EhaA) y Neae-VHH (Intimina) que ya hemos analizado previamente.



**Figura 50.** Esquema de un ensayo MACS.

Esquema de un ensayo MACS en el que las bacterias que expresan diferentes *Nanobodies* en su superficie son incubadas con el antígeno marcado con biotina para seleccionar aquellas que unen específicamente

dicho antígeno. Las bacterias unidas al antígeno son reconocidas posteriormente con anti-biotina mAb marcado con microesferas superparamagnéticas que quedan retenidas en una resina de hierro gracias a la acción de un imán de gran potencia. Finalmente se aíslan las bacterias retenidas quitando la columna del imán y eluyendo con LB para su posterior crecimiento.

Expresamos Neae-VHH (Intimina) y VHH-A (EhaA) en *E. coli* UT5600 y llevamos a cabo el ensayo de MACS siguiendo el esquema reflejado en la Figura 50. Utilizamos dos *Nanobodies* diferentes frente a los antígenos fibrinógeno humano y TirM<sub>EHEC</sub>, que corresponde a la región extracelular de la proteína Tir (*translocated intimin receptor*) de EHEC O157:H7. Las bacterias que presenten correctamente el Nanobody en su superficie reconocerán su antígeno y quedarán retenidas por el imán.

**Tabla 8.** Selección mediante MACS de *Nanobodies* expresados en la superficie de *E. coli*.

Transportador	Antígeno biotinilado	No unido (%)	Unido (%)
pAk-Not	Anti-E mAb	98	2
Neae-VHHFib (Intimina)	Anti-E mAb	1	99
	Fibrinógeno	3	97
	TirM	98	2
VHHFib-A (EhaA)	Anti-E mAb	18	82
	Fibrinógeno	31	69
	TirM	97	3

Transportador	Antígeno biotinilado	No unido (%)	Unido (%)
Neae-VHHTirM (Intimina)	Fibrinógeno	98	2
	TirM	25	75
VHHTirM-A (EhaA)	Fibrinógeno	99,8	0,2
	TirM	34	66

Empleamos ambos antígenos frente a todas las construcciones para comprobar la especificidad de la unión *Nanobody*-antígeno. Optimizamos estos ensayos con  $2 \times 10^8$  bacterias totales y una concentración de antígeno entre 50 y 150 nM. Observamos que sólo empleando las parejas correctas antígeno-anticuerpo, V<sub>HH</sub>-Fib con fibrinógeno y V<sub>HH</sub>-TirM con TirM, conseguimos unir a la columna entre el 65% y el 97% de las bacterias viables (unidades formadoras de colonias) (Tabla 8). Los mejores resultados se obtienen con ambos *Nanobodies* en las fusiones al dominio transportador de Intimina Neae. Estos resultados sugieren que es posible la selección mediante MACS de *Nanobodies* fusionados tanto al dominio transportador de Intimina como de EhaA.



## **DISCUSIÓN**



En este trabajo hemos querido profundizar en las características comunes de los Sistemas de Secreción tipo V (SST5), concretamente de los autotransportadores (ATs) clásicos (tipo Va) y proteínas próximas estructuralmente como es Intimina (Henderson et al., 2004; Dautin y Bernstein, 2007; Yen et al., 2008). Este trabajo parte de la experiencia desarrollada en el laboratorio con el dominio transportador de la IgAP de *Neisseria gonorrhoeae* (Veiga et al., 1999; Veiga et al., 2002; Veiga et al., 2003a; Veiga et al., 2004). Nuestro trabajo profundiza estos estudios con un abordaje genérico que incluye diferentes autotransportadores seleccionados de los principales grupos de proteobacterias. Analizamos la región transportadora de estos SST5, caracterizando su expresión, plegamiento, y estructura oligomérica, así como la dependencia de chaperonas periplásmicas y del complejo Bam de membrana externa. Para estos estudios hemos aprovechado la capacidad de los ATs de intercambiar su dominio pasajero natural por otros dominios heterólogos, así como el hecho de su funcionalidad en otras especies.

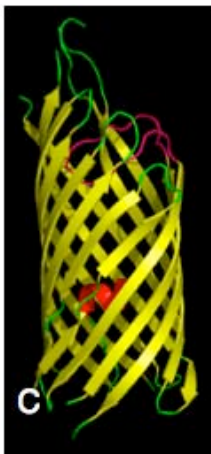
Hemos usado péptidos de pequeño tamaño como pasajeros heterólogos para el análisis de la estructura-función del dominio transportador, minimizando así el papel desempeñado por el pasajero. Por otra parte, hemos estudiado la capacidad de secreción de anticuerpos monodominio o *Nanobodies* por los dominios transportadores estudiados con vistas a futuras aplicaciones biotecnológicas en la selección de anticuerpos recombinantes presentados en la superficie de *E. coli* (*bacterial display*). Todos estos puntos serán discutidos a continuación.

### **Características comunes del dominio de transporte de los Autotransportadores clásicos.**

Nuestro estudio bioinformático inicial de los dominios AT de EhaA, ShdA, IgAP, BruA y VacA reveló la posible presencia conservada en todos ellos de una hélice  $\alpha$  y 12 hojas  $\beta$  antiparalelas (Figura 15). Un modelo 3D de estos dominios mostró a la hélice  $\alpha$  dentro del poro hidrofílico del barril  $\beta$  (Figura 16), en una estructura muy similar a la que había aparecido en el cristal de NalP obtenido mediante replegamiento de cuerpos de inclusión (Oomen et al., 2004). Aunque los datos

## Discusión

de modelado sugieren una conservación en la estructura 3D de todos los dominios ATs, los programas empleados utilizan como "molde" proteínas de estructura conocida y por lo tanto desvían los modelos hacia estructuras ya depositadas en las bases de datos. Sin embargo, con posterioridad a nuestro estudio bioinformático se publicó una segunda estructura 3D basada en datos de cristalografía del dominio transportador de EspP de *E. coli* O157:H7, purificado desde la membrana externa en forma nativa (Barnard et al., 2007), que reveló la presencia de una corta hélice  $\alpha$  dentro del poro de un barril  $\beta$  formado por 12 hojas  $\beta$  antiparalelas (Figura 51). La hélice  $\alpha$  de EspP en el cristal es sólo un fragmento, pues este AT se autoproteolítica dentro del barril  $\beta$  cortando su hélice  $\alpha$  (Barnard et al., 2007). En conjunto, estos datos apoyan fuertemente la hipótesis de que todos los dominios de transporte de los ATs clásicos presentan una estructura similar a la presentada inicialmente para NalP, compuesta por una hélice  $\alpha$  que ocupa el poro de un barril  $\beta$  formado por 12 hojas  $\beta$  antiparalelas (Oomen et al., 2004). En cualquier caso es importante remarcar que estos cristales representan exclusivamente la etapa final de la translocación a través de la ME.



**Figura 51.** Cristal del dominio transportador de EspP.

Se muestra el cristal de EspP descrito por (Barnard et al., 2007) donde se muestran las 12 hojas  $\beta$  (amarillo) y un fragmento de la hélice  $\alpha$  (rojo) dentro del barril  $\beta$ . Una vez plegado el barril  $\beta$  ocurre un corte autoproteolítico en el interior que deja un fragmento de la hélice  $\alpha$  dentro de éste (extremo N-terminal). El bucle-5 (en morado) después del corte intramolecular se introduce en el poro del barril  $\beta$  para bloquearlo. En amarillo las hojas  $\beta$ , en rojo las hélices  $\alpha$  y en verde los bucles.



Todos los dominios transportadores estudiados, excepto el derivado de VacA, fueron capaces de secretar distintos dominios pasajeros heterólogos (6xHis, E-tag, cremalleras de leucinas y Nanobodies) exponiéndolos en la superficie de *E. coli*. El dominio de VacA no se pliega correctamente en *E. coli*, como lo demuestra la ausencia de cambio de movilidad en geles de SDS-PAGE (Figura 18), no siendo capaz de translocar los dominios pasajeros a la superficie bacteriana (Figuras 18 y 19). El resto de dominios estudiados muestran diferentes niveles de acumulación en *E. coli*, siendo mayores los de los derivados de  $\gamma$ -proteobacterias (EhaA y ShdA), seguidos de los derivados de  $\beta$ -proteobacterias (IgAP y NalP) y finalmente del derivado de  $\alpha$ -proteobacterias (BruA) del que sólo una parte de la proteína expresada está correctamente plegada (Figura 18A). Estos datos sugerían ya una interacción de los ATs con la maquinaria de *E. coli* dedicada al transporte e inserción de proteínas en la membrana externa que reconocería de manera más eficiente a ATs de grupos próximos filogenéticamente (Figura 14). Esta interpretación se refuerza por el hecho de que en ausencia de las proteínas de ME mayoritarias de *E. coli*, el plegamiento e inserción en ME de BruA se ve favorecido (Figura 18B).

Nuestro trabajo también demuestra que la hélice  $\alpha$  de los dominios transportadores tiene un papel esencial en la estabilidad del barril  $\beta$  y la secreción del dominio pasajero. Esta conclusión está de acuerdo con observaciones en las que mutaciones puntuales en la hélice  $\alpha$  del AT Tsh inhiben el transporte del pasajero (Kostakioti y Stathopoulos, 2006). Los resultados obtenidos con las delecciones (Figura 23) y los intercambios de hélices  $\alpha$  entre los dominios transportadores (Figuras 24 y 25) demuestran que ocurre una co-evolución entre la hélice  $\alpha$  y el barril  $\beta$ , ya que cualquier secuencia no es capaz de restablecer la estabilidad del barril, aunque ciertas combinaciones recuperan parcialmente la capacidad de transporte. Deben darse interacciones concretas entre la hélice  $\alpha$  y el barril  $\beta$  de cada AT que confieren estabilidad a la estructura 3D.

Por otra parte hemos observado que las estructuras cuaternarias predominantes de los dominios transportadores de EhaA, ShdA, NalP y BruA en la ME son las formas monoméricas y dimericas, tanto mediante entrecruzamiento *in vivo* con DSP (Figura 20) como por BN-PAGE con proteína purificada de ME (Figura 21). La formación de estructuras oligoméricas superiores no está conservada y sólo se observa en el caso de IgAP por BN-PAGE (Figura 21), confirmando los datos anteriores obtenidos en el laboratorio con este transportador (Veiga et al., 2002), aunque con una construcción diferente a la empleada en este trabajo (HE $\beta$ ). En nuestro caso, la construcción HEI no se entrecruzó *in vivo* con DSP, cosa que sí se observó con HE $\beta$  (Veiga et al., 2002). Este hecho puede ser debido a que los grupos amino no son accesibles al entrecruzamiento en HEI debido a su menor tamaño (35 kDa frente a los 46 kDa de C-IgAP en HE $\beta$ ). Nuestros datos de ATs como monómeros y dímeros concuerdan con los cristales de los dominios transportadores de NalP (Oomen et al., 2004) y EspP (Barnard et al., 2007), ambos monómeros, y con trabajos que han descrito bioquímicamente la formación de monómeros y dímeros en AIDA-I y Tsh, cuya forma principal es un monómero pero una pequeña fracción está como dímero en la superficie de la bacteria y en solución (Muller et al., 2005). Por lo tanto la formación de estructuras oligoméricas no parece estar relacionada con el mecanismo de secreción del dominio pasajero, siendo procesos independientes la oligomerización y la secreción.

En el trabajo anterior con HE $\beta$  también se observó que la proteína purificada embebida en liposomas formaba canales hidrofílicos de un tamaño estimado de 2 nm que permitían el paso de azúcares (Veiga et al., 2002). Sin embargo, nuestros datos de sensibilidad a antibióticos hidrofílicos no nos han permitido detectar la presencia de un canal hidrofílico *in vivo* con nuestras construcciones de los dominios transportadores (Tabla 6), lo que sugiere que el poro del barril  $\beta$  de los ATs está bloqueado *in vivo*, posiblemente por la hélice  $\alpha$  o por un bucle externo como ocurre en el caso de EspP después de la proteólisis (Barnard et al., 2007).

### **Proteínas celulares implicadas en el plegamiento e inserción en la membrana externa de las proteínas del SST5.**

Los distintos niveles de expresión y plegamiento de los diferentes autotransportadores seleccionados en *E. coli* (una  $\gamma$ -proteobacteria), así como la mejora en niveles de expresión en ausencia de otras proteínas de ME (Figura 18), fueron las primeras indicaciones indirectas de que el reconocimiento de estos dominios por la maquinaria celular de plegamiento e inserción en la ME era un elemento esencial durante la secreción. Nuestros datos con mutantes nulos y mutantes de depleción demuestran que los ATs interaccionan con diferentes chaperonas periplásmicas y componentes de ME necesarios para su plegamiento e inserción. Con respecto a las chaperonas periplásmicas hemos observado que dependiendo del AT concreto analizado se emplea la ruta SurA y/o la ruta Skp/DegP (Figura 28). Sólo el AT EhaA (HEA) es capaz de usar indistintamente ambas rutas para su tránsito por el periplasma. Por el contrario, los ATs ShdA (HES), IgAP (HEI) y NalP (HEN) utilizan SurA como la chaperona mayoritaria durante su paso por el periplasma, mientras que el AT BruA (HEBA) utiliza preferentemente la ruta Skp/DegP e interacciona con FkpA. La utilización mayoritaria de la ruta SurA por varios ATs (e Intimina, ver más adelante) coincide con observaciones recientes donde se destaca el papel de SurA como principal responsable del plegamiento de las proteínas integrales de ME en *E. coli* (Sklar et al., 2007b).

Con el objetivo de esclarecer el uso diferencial de las chaperonas periplásmicas por los ATs analizamos las similitudes entre los ortólogos de *surA*, *skp*, *degP* y *fkpA* en los genomas de las distintas proteobacterias que hemos seleccionado para este estudio. Podemos observar que conforme aumenta la distancia filogenética entre las especies de proteobacterias disminuye la identidad entre los ortólogos identificados (Tabla 9). De hecho, sólo se identifican ortólogos de *surA* y *degP* en todas las especies, mientras que no pudimos identificar secuencias ortólogas a *skp* y *fkpA* en los genomas de *B. abortus* y *H. pylori*. Por lo tanto, la presencia de ortólogos de estas chaperonas en las distintas especies no justifica la preferencia observada con la expresión de los ATs en *E. coli*.

**Tabla 9.** Similitud a nivel de secuencia de las chaperonas periplásmicas entre proteobacterias.

Organismo	Clase	FkpA		Skp		DegP		SurA	
		Nº aa	Identidad	Nº aa	Identidad	Nº aa	Identidad	Nº aa	Identidad
<i>E. coli</i> K12	γ	270	-	161	-	474	-	428	-
<i>E. coli</i> EDL933	γ	270	99	161	99	474	100	428	100
<i>S. typhi</i> LT2	γ	272	91	161	90	475	93	428	91
<i>N. gonorrhoeae</i>	β	272	32	185	20	499	30	333	24
<i>N. meningitidis</i>	β	272	32	166	19	499	31	348	22
<i>B. abortus</i>	α	-	-	-	-	474	31	318	15
<i>H. pylori</i>	ε	-	-	-	-	476	36	413	15

Nota: Secuencia tomada de GenBank y porcentaje de identidad obtenido mediante apilamiento de secuencias con el servidor web Clustalw2 (Larkin et al., 2007).

No obstante lo anterior, dadas las diferencias entre los distintos ortólogos y su dependencia de SurA, parece justificable que las construcciones HEI y HEN sean muy sensibles a la depleción de SurA (Figura 30). También es posible que el mutante *fkpA* sólo afecte a la expresión de HEBA porque este dominio AT tiene un número muy elevado de prolina (Tabla 10) lo que le haría más dependiente de su actividad peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa (PPIasa).

**Tabla 10.** Número de prolina de los dominios transportadores seleccionados.

AT	Organismo	Grupo	nº aa dominio transportador	nº Prolinas
EhaA	<i>E. coli</i> EHEC	γ	339	6
ShdA	<i>S. t</i>	γ	320	4
IgAP	<i>N. g</i>	β	307	4
NaIP	<i>N. m</i>	β	308	3
BruA	<i>B. a</i>	α	338	12
VacA	<i>H. p</i>	ε	373	4

Nuestros datos también demuestran que todos los dominios transportadores analizados precisan de un complejo Bam funcional para su correcto plegamiento e inserción en la ME. De manera independiente a nuestro trabajo se ha descrito también la necesidad de BamA (YaeT) en la secreción de los ATs completos lcsA, AIDA-I y BrkA (Jain y Goldberg, 2007). El complejo Bam es esencial para la biogénesis de proteínas integrales de ME que contienen barriles  $\beta$  como OmpA, LamB, OmpF, OmpC, PhoE y TolC (Bos et al., 2007a; Ruiz et al., 2006a). Por el contrario otras proteínas integrales de ME como PulD (una secretina) (Collin et al., 2007) y Wza (Dong et al., 2006; Collins y Derrick, 2007) son independientes del complejo Bam. Esto podría estar relacionado con que Wza (y quizá PulD) tienen una región transmembrana basada en hélices  $\alpha$  anfipáticas y no en hojas  $\beta$  como el resto de proteínas de ME. Por lo tanto, el complejo Bam parece estar muy especializado en proteínas de ME con barriles  $\beta$ , incluyendo a los ATs.

Al igual que con las chaperonas periplásmicas, conforme aumenta la distancia filogenética disminuye la identidad entre los ortólogos de *bamA* (Tabla 11). Ésto puede conllevar un aumento de la sensibilidad a la depleción de BamA que se aprecia con HEI (IgAP), HEN (NalP) y HEBA (BruA) con respecto a HEA (EhaA) y HES (ShdA) (ver Figuras 32 y 34).

**Tabla 11.** Similitud a nivel de secuencia de BamA entre proteobacterias.

Organismo	Clase proteobacteria	Nº aa	Identidad	Penúltimo aa de BamA	Último aa	AT	Penúltima posición	Último aa
<i>E. coli</i> K12	gamma	810	-	T	W	-	-	-
<i>E. coli</i> EDL933	gamma	810	100	T	W	EhaA	Q	F
<i>S. typhi</i> LT2	gamma	804	93	T	W	ShdA	N	W
<i>N. gonorrhoeae</i>	beta	792	33	T	F	IgAP	R (+)	F
<i>N. meningitidis</i>	beta	797	32	T	F	NalP	R (+)	F
<i>B. abortus</i>	alpha	781	28	K (+)	F	BruA	R (+)	W
<i>H. pylori</i>	epsilon	906	21	R (+)	F	VacA	S	F

Nota: Secuencia tomada de GenBank y porcentaje de identidad obtenido mediante apilamiento de secuencias con el servidor web Clustalw2 (Larkin et al., 2007).

No observamos una relación clara entre la secuencia C-terminal de los ATs (residuos último y penúltimo), su expresión en *E. coli* y sensibilidad a la depleción

de BamA (Tabla 11). NalP, IgAP y BruA poseen un residuo positivo en la penúltima posición mientras que EhaA, ShdA y VacA contienen un aminoácido sin carga. Se ha descrito *in vitro* una especificidad de especie de la proteína BamA determinada por el penúltimo residuo de la región C-terminal de las proteínas de ME (Robert et al., 2006).

Finalmente, en nuestro estudio no es posible discernir si el complejo Bam juega un papel adicional en la translocación del dominio pasajero, ya que la depleción de BamA conlleva inmediatamente una acumulación de proteína desplegada.

Realizamos una búsqueda de otras proteínas implicadas específicamente en el proceso de secreción de los SST5 generando una banca de mutantes por transposición y expresando en ella la construcción Jun $\beta$  pero no conseguimos caracterizar nuevos genes implicados directamente en el proceso. Es posible que no existan otros genes no esenciales para *E. coli* que sean estrictamente necesarios para la translocación de Jun $\beta$ .

### **Similitudes y diferencias de Intimina con los Autotransportadores clásicos.**

En el caso del dominio transportador de Intimina se predicen entre 16 y 18 hojas  $\beta$  mientras que para los ATs son 12 hojas  $\beta$  (comparar Figuras 15 y 38) y la orientación del dominio pasajero y transportador es la contraria (comparar Figuras 5 y 7), pero ambos son capaces de secretar pequeños péptidos a la superficie bacteriana con niveles similares (comparar Figura 19 y 41). Es de destacar que siempre (tanto en los cristales como en las predicciones) los barriles  $\beta$  de proteínas de ME bacteriana están compuestos por un número par de hojas  $\beta$ . La única proteína conocida con estructura de barril  $\beta$  y un número impar de hojas  $\beta$  corresponde a la proteína VDAC de la ME de mitocondrias (Hiller et al., 2008). Las delecciones del barril  $\beta$  de Intimina Int535 e Int522 no son estables (Figuras 39 y 40), indicando que son necesarios los 550 primeros aminoácidos para que el barril  $\beta$  sea funcional y por tanto capaz de translocar a la superficie pequeños péptidos.

Una diferencia importante a nivel de estructura entre Intimina y los ATs radica en la falta de una hélice  $\alpha$  entre el dominio pasajero y el transportador (Figura 38). La presencia del dominio D0 en Intimina mejora la exposición en la superficie de la bacteria del dominio pasajero (Figura 41).

En cuanto a estructura cuaternaria de Intimina es principalmente un dímero estable sin que se aprecie forma monomérica (Figura 42). Este dímero no depende de la presencia o no del dominio D0 y del resto de dominios secretados. Por lo tanto, el dímero de Intimina es más estable que el observado con los ATs.

Por último, Intimina emplea principalmente la ruta SurA y en menor medida la ruta Skp/DegP. Al igual que los ATs requiere el complejo Bam funcional para su correcto plegamiento e inserción en ME (Bodelon et al., 2009) (Anexo I). Así, aunque Intimina presenta diferencias estructurales con los ATs clásicos, entre ellas también la estructura 3D de los dominios pasajeros, la dependencia de chaperonas periplásmicas y del complejo Bam son rasgos comunes en ambos sistemas.

### **Evidencias e incertidumbres en el mecanismo de secreción de los SST5**

En esta sección queremos arrojar luz en el mecanismo de secreción de los SST5 en base a los resultados de esta Tesis Doctoral y a publicaciones previas de nuestro grupo y de otros grupos. En la Introducción se han presentado los tres modelos propuestos para la secreción de los SST5 (ver Figura 9).

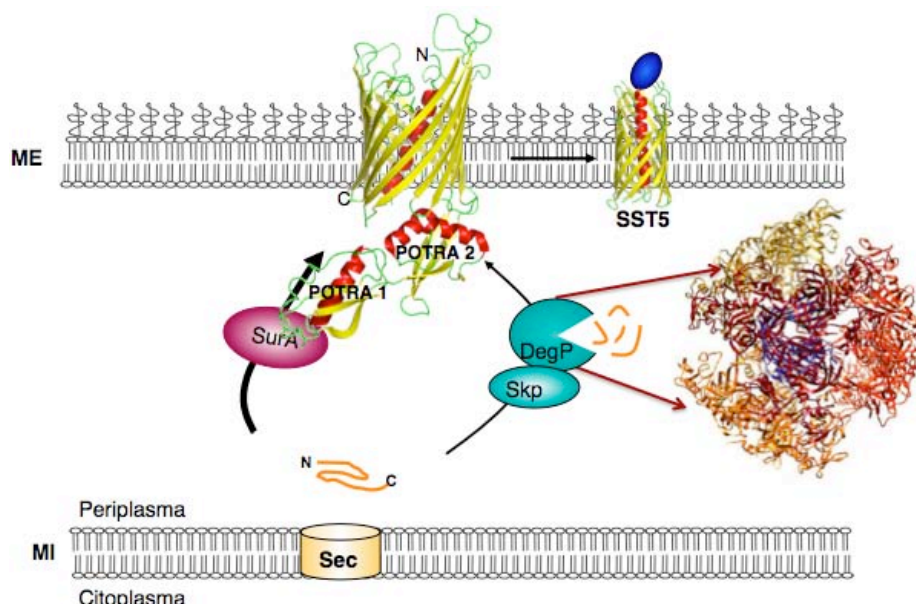
Creemos que en la actualidad ha quedado bien establecido la existencia de un intermediario periplásmico de los SST5 que interacciona con diversas chaperonas periplásmicas. Se han observado interacciones tanto con el dominio transportador (resultados de este trabajo) como con el dominio pasajero. Por ejemplo, IcsA de *Shigella flexneri* y EspP de *E. coli* O157:H7 requieren de Skp, DegP y SurA para el correcto plegamiento del dominio pasajero y del dominio transportador (Purdy et al., 2007; Wagner et al., 2009; Ruiz-Perez et al., 2009).

También se ha comprobado la dependencia de los factores periplásmicos de formación de puentes disulfuro para el plegamiento correcto de los pasajeros de IcsA e Intimina y de pasajeros heterólogos tipo anticuerpos (Veiga et al., 1999; Veiga et al., 2004; Brandon y Goldberg, 2001; Bodelon et al., 2009). Estas interacciones con chaperonas periplásmicas sugieren que los SST5 pueden adquirir un cierto grado de plegamiento en el periplasma. Existen evidencias que sustentan esta posibilidad y que demuestran un cierto grado de plegamiento en el periplasma tanto del dominio pasajero como del dominio transportador, previo incluso a su inserción en la ME. Por ejemplo, se ha descrito que IcsA adquiere una conformación resistente a la proteólisis en el periplasma (Brandon y Goldberg, 2001). Por otra parte, quimeras entre la subunidad B de la toxina colérica (CtxB) y EspP son translocadas en forma plegada a través de la ME (Skillman et al., 2005). En este sentido también apuntan los datos de translocación del dominio pasajero de Intimina y de anticuerpos con puentes disulfuro ya formados (este trabajo; (Veiga et al., 2004; Bodelon et al., 2009). Por último, es de remarcar la detección de un intermediario periplásmico de EspP en el que el barril  $\beta$  está al menos parcialmente plegado y contiene la hélice  $\alpha$  en su interior (Ieva et al., 2008).

También ha quedado determinado que los SST5 interaccionan con el complejo Bam (esta Tesis; (Jain y Goldberg, 2007; Bodelon et al., 2009) ya que la depleción de BamA (YaeT/Omp85) bloquea la inserción en la ME de los barriles  $\beta$ . Sólo se conoce en la actualidad la estructura 3D de los dominios periplásmicos POTRA1-4 de BamA (Kim et al., 2007). Aunque la estructura 3D de la región transmembrana de BamA no está determinada, se conoce la estructura de un homólogo, FhaC perteneciente a los TpsB (ver Introducción; Pág. 27). FhaC contiene un dominio transmembrana C-terminal formado por un barril  $\beta$  de 16 hojas en el que el canal hidrofílico está bloqueado por una hélice  $\alpha$  proveniente del extremo N-terminal y un gran bucle (L6) extracelular del barril  $\beta$ . FhaC contiene una región periplásmica con dos dominios POTRA entre la hélice  $\alpha$  y el barril  $\beta$  (Clantin et al., 2007). Un resumen de las interacciones de los SST5



con las chaperonas periplásmicas y el complejo Bam se esquematizan en la Figura 52.



**Figura 52.** Modelo de secreción para los Sistemas de Secreción tipo V.

El complejo Bam representado por el cristal de FhaC (Clantin et al., 2007) y los SST5 por el cristal de NalP (Oomen et al., 2004). Cristal de la estructura dodecamérica asimétrica de DegP con el cristal de OmpC en su interior (Krojer et al., 2008). Se indica SurA como ruta principal de plegamiento de los SST5 (flecha gruesa) con respecto a la ruta alternativa Skp/DegP (flecha fina).

La gran incógnita es cual es el canal empleado para la translocación de las proteínas de los SST5. Creemos que dada la capacidad demostrada de translocación de dominios pasajeros parcialmente plegados es muy improbable que el poro presente en el barril  $\beta$  de los SST5 ( $\sim 1$  nm) sea el canal utilizado para dicha secreción (Oomen et al., 2004; Barnard et al., 2007). La incorporación temprana de la hélice  $\alpha$  en el barril  $\beta$  dificultaría aún más esta posibilidad (Ieva et al., 2008). También creemos que la ausencia de formas oligoméricas conservadas en los dominios de transporte de SST5 (este trabajo) hace poco probable la posibilidad de que la translocación ocurra a través de un canal común formado por la oligomerización de los dominios transportadores. Por lo tanto, creemos que es más plausible que el canal empleado sea aportado por el complejo Bam y, de hecho, se han detectado la formación de canales hidrofílicos de conductancia variable en liposomas conteniendo BamA purificado (Stegmeier y Andersen, 2006; Robert et al., 2006).

Existen diferentes posibilidades para que BamA, o el complejo Bam, formen un canal hidrofílico para la translocación. La primera consiste en que dicho canal lo constituya el poro interno de la región transmembrana de BamA. Por homología con FhaC -en el que la hélice  $\alpha$  y el bucle L6 se hubieran desplazado- podemos suponer que BamA dispondría de un canal interno de  $\sim 1.6$  nm (Clantin et al., 2007). En BamA no se predice la existencia de una hélice a N-terminal, pero si la de un bucle equivalente a L6 de FhaC (Knowles et al., 2009). Argumentos en contra de esta posibilidad son que el poro hidrofílico sigue siendo estrecho para la translocación de pasajeros nativos tipo hélice  $\beta$  plegada (3-4 nm) aunque ya permitiría el paso de dominios Ig parcialmente plegados. Además, frente a la situación de las proteínas TpsA secretadas por TpsB (ver Introducción), los pasajeros de los SST5 están anclados a un barril  $\beta$ , por lo que el barril de BamA debería abrirse para permitir la difusión del dominio transportador en la membrana. Sin embargo, la apertura de barriles  $\beta$  en la membrana es muy desfavorable termodinámicamente (Koebnik et al., 2000).

La segunda posibilidad sería que BamA (o el complejo Bam) formase estructuras oligoméricas mayores con un canal interno común. Esta hipótesis se apoya en la observación *in vitro* de formas oligoméricas de BamA, en concreto tetrámeros (Robert et al., 2006). También se han observado la formación de tetrámeros *in vitro* para HMW1B, una proteína de la familia TpsB (Surana et al., 2004). En contra estaría la observación de que el complejo Bam *in vivo* está compuesto por una unidad de cada uno de los componentes (BamA-E) (Stenberg et al., 2005).

Existiría una tercera posibilidad en la que el complejo Bam distorsionaría la interfase con los lípidos de la ME favoreciendo tanto la translocación del dominio pasajero a través de canales en la bicapa como la inserción del barril  $\beta$  en la fase lipídica (Knowles et al., 2009). Los componentes accesorios del complejo Bam, las lipoproteínas BamB-E, podrían desempeñar un papel importante en este proceso, además de facilitar la interacción de las proteínas de ME con los dominios POTRA (Walther et al., 2009) (Knowles et al., 2008).

Finalmente, dada la ausencia de ATP en el periplasma, la energía necesaria para cualquiera de estas posibilidades vendría dada, por un lado, por el plegamiento e inserción del barril  $\beta$  en la ME (que sería suficiente para pasajeros pequeños o dominios Ig) y por el plegamiento completo en la superficie de la bacteria de la hélice  $\beta$  de los pasajeros nativos de gran tamaño (Oliver et al., 2003; Junker et al., 2009).

### ***Bacterial display* de anticuerpos recombinantes empleando los SST5.**

Los dominios transportadores seleccionados e Intimina son capaces de exponer en la superficie de la célula *Nanobodies* funcionales con independencia de la orientación de las fusiones, que es opuesta la de los dominios ATs con respecto a Intimina (Figura 43). En todos los casos los *Nanobodies* reconocen específicamente su antígeno, como hemos comprobado mediante ELISA con el antígeno inmovilizado, y también mediante FACS y MACS con el antígeno en solución (Figuras 47, 48 y Tabla 8). Las construcciones de los *Nanobodies* con el dominio transportador derivado de EhaA (VHH-A) y el derivado de Intimina (Neae-VHH) son las que presentan mejor nivel de expresión en la superficie de *E. coli* K-12 y a su vez mejores niveles de unión al antígeno (Figuras 46 y 47). Esto es probable que sea debido a que ambos dominios de transporte son de *E. coli*, aunque de la cepa EHEC O157:H7. En este trabajo también hemos demostrando la posibilidad de emplear la presentación en la superficie de *E. coli* con los dominios de transporte de Intimina y EhaA para la selección de *Nanobodies* frente a antígenos específicos utilizando la tecnología de MACS (Tabla 8). Por lo tanto estos experimentos piloto abren la posibilidad inmediata de seleccionar clones de alta afinidad desde genotecas de *Nanobodies* clonadas en vectores con estos dominios de transporte. Los *Nanobodies* presentan un gran potencial para su uso en terapia en humanos por lo que el desarrollo de esta tecnología de *bacterial display* puede tener una importante aplicación biotecnológica (Saerens et al., 2008; Wesolowski et al., 2009). Frente a otros métodos de selección más establecidos, como el *phage display*, el *bacterial display* podría seleccionar nuevos clones de diferentes propiedades (p.ej. afinidad y estabilidad) y además

## Discusión

presenta la ventaja de que emplea el antígeno en solución y no asociado a una superficie que pueda alterar sus propiedades.

## **CONCLUSIONES**



Del trabajo presentado en esta tesis podemos obtener las siguientes conclusiones.

1. La estructura 3D de los dominios transportadores de los autotransportores está conservada y compuesta por una hélice  $\alpha$  y 12 hojas  $\beta$  anfipáticas. En el caso de Intimina el dominio de transporte tiene una estructura compuesta por 16 o 18 hojas  $\beta$ . En ambos casos, dicha región es necesaria para translocar a la superficie de la bacteria tanto péptidos como dominios polipeptídicos.
2. La formación de oligómeros de gran tamaño por los dominios transportadores no es una característica conservada en los SST5, la estructura más frecuente es el monómero y el dímero. Entre los ATs estudiados, sólo en el caso de la IgAP de *N. gonorrhoeae* aparecen formas oligoméricas de gran tamaño.
3. La hélice  $\alpha$  del dominio transportador de los ATs es necesaria para la estabilidad de este dominio, para su inserción en la membrana externa y para la translocación del dominio pasajero. Los intercambios hélices  $\alpha$  entre dominios ATs demuestran que sólo algunas combinaciones son capaces de restaurar parcialmente la inserción en membrana externa y la función de transporte.
4. Los SST5 utilizan la ruta SurA y/o la ruta Skp/DegP para su tránsito por el periplasma cuando se expresan heterológamente en *E. coli*. La mayoría de los SST5 utilizan al menos la ruta SurA. En *E. coli*, DegP es la principal responsable de la degradación en el periplasma de los dominios de transporte que no están correctamente plegados y/o insertados en membrana.
5. El complejo Bam es necesario para la inserción en la membrana externa de todos los dominios transportadores analizados de los SST5.
6. Los dominios transportadores de los SST5 pueden exponer eficientemente en la superficie de *E. coli* *Nanobodies* funcionales capaces de unir su antígeno. Los

## CONCLUSIONES

dominios que presentan mejores niveles de expresión de estos *Nanobodies* son los correspondientes a EhaA e Intimina, ambos de *E. coli* O157:H7.

7. Hemos demostrado que es posible la selección de *Nanobodies* frente a un antígeno concreto gracias a su presentación con SST5 en la superficie de *E. coli* y empleando la técnica MACS (*Magnetic Cell Sorting*) para su enriquecimiento.



Of this Doctoral Thesis we obtain the following conclusions.

1. The 3D structure of the transporter domains of the autotransporters is conserved and composed by an  $\alpha$ -helix and 12 amphipathic  $\beta$ -sheets. In the case of Intimin the transporter domain has a structure composed by 16 or 18  $\beta$ -sheets. In both cases, this region is necessary for translocation to the surface of the bacteria of peptides and polipeptide domains.
2. Formation of large oligomers by transporter domains is not a conserved feature in the T5SS. Among the ATs studied, the more frequent quaternary structures are the monomer and dimer. Only the IgAP of *N. gonorrhoeae* is able to form a large oligomer.
3. The transporter domains from ATs contain an  $\alpha$ -helix that is necessary for the stability of this domain, for its insertion into the outer membrane and for translocation of the passenger domain. The exchange of  $\alpha$ -helices between ATs domains shows that only some combinations are able to partially restore outer membrane insertion and transport function.
4. T5SS employ SurA and/or Skp/DegP pathways for their transit across the periplasm when expressed in *E. coli*. Most of the T5SS analyzed use at least SurA pathway. In *E. coli*, DegP is the major protease involved in the degradation of the transport domains that are not correctly folded and/or inserted into the outer membrane.
5. The Bam complex is necessary for the insertion into the outer membrane of all transport domains analyzed of the T5SS.
6. The transport domains of T5SS are able to display on the surface of *E. coli* functional Nanobodies capable of binding their cognate antigen. The transport domains showing high levels of Nanobody display are those from EhaA and Intimin, both from *E. coli* O157:H7.

## CONCLUSIONES

7. We have demonstrated that it is possible to enrich, using Magnetic Cell Sorting (MACS), Nanobodies against a specific antigen by means of their surface display in *E. coli* with T5SS.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abate, C., Luk, D., Gentz, R., Rauscher, F.J., 3rd y Curran, T. (1990) Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: both Fos and Jun contact DNA directly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1032-1036.
- Adey, N.B., Sparks, A.B., Beasley, J. y Kay, B.K. (1996) Construction of random peptide libraries in bacteriophage M13. In: *Phage display of peptides and proteins*. Kay, B.K., Winter, J. y McCafferty, J. (eds). San Diego, California: Academic Press, Inc., pp. 67-78.
- Alba, B.M. y Gross, C.A. (2004) Regulation of the *Escherichia coli* sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* 52: 613-619.
- Arie, J.P., Sassoon, N. y Betton, J.M. (2001) Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 39 199-210.
- Armstrong, N., Adey, N.B., McConnell, S.J. y Kay, B.K. (1996) Vectors for phage display. In: *Phage display of peptides and proteins*. Kay, B.K., Winter, J. y McCafferty, J. (eds). San Diego, California: Academic Press, Inc., pp. 35-53.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Azriel-Rosenfeld, R., Valensi, M. y Benhar, I. (2004) A Human Synthetic Combinatorial Library of Arrayable Single-chain Antibodies based on Shuffling in Vivo Formed CDRs into General Framework Regions. *J Mol Biol* 335: 177-192.
- Backert, S. y Selbach, M. (2008) Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol* 10: 1573-1581.
- Bagos, P.G., Liakopoulos, T.D., Spyropoulos, I.C. y Hamodrakas, S.J. (2004) PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins. *Nucleic Acids Res* 32: W400-404.
- Bakker, D., van Zijderveld, F.G., van der Veen, S., Oudega, B. y de Graaf, F.K. (1990) K88 fimbriae as carriers of heterologous antigenic determinants. *Microb Pathog* 8: 343-352.
- Barnard, T.J., Dautin, N., Lukacik, P., Bernstein, H.D. y Buchanan, S.K. (2007) Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat Struct Mol Biol* 14 1214-1220.

## Bibliografía

- Bateman, A. y Bycroft, M. (2000) The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J Mol Biol* 299 1113-1119.
- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F.X. y Gross, C.A. (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *Embo J* 20: 285-294.
- Benhar, I. (2001) Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv* 19: 1-33.
- Bern, M. y Goldberg, D. (2005) Automatic selection of representative proteins for bacterial phylogeny. *BMC Evol Biol* 5: 34.
- Bernstein, H.D. (2007) Are bacterial 'autotransporters' really transporters? *Trends Microbiol* 15 441-447.
- Bigelow, H.R., Petrey, D.S., Liu, J., Przybylski, D. y Rost, B. (2004) Predicting transmembrane beta-barrels in proteomes. *Nucleic Acids Res* 32: 2566-2577.
- Bitto, E. y McKay, D.B. (2002) Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. *Structure* 10 1489-1498.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. y Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1474.
- Bodelon, G., Marin, E. y Fernandez, L.A. (2009) Role of periplasmic chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in folding and secretion of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 191: 5169-5179.
- Bos, M.P., Robert, V. y Tommassen, J. (2007a) Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* 61: 191-214.
- Bos, M.P., Robert, V. y Tommassen, J. (2007b) Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain. *EMBO Rep* 8 1149-1154.
- Boschiroli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevielle, C., Lavigne, J.P., Liautard, J.P., Ramuz, M. y O'Callaghan, D. (2002) Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol* 90: 341-348.
- Brandon, L.D. y Goldberg, M.B. (2001) Periplasmic transit and disulfide bond formation of the autotransported *Shigella* protein IcsA. *J Bacteriol* 183: 951-958.

- Bronstein, P., Marrichi, M. y DeLisa, M.P. (2004) Dissecting the twin-arginine translocation pathway using genome-wide analysis. *Res Microbiol* 155 803-810.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J. y Kuipers, O.P. (2008) LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol* 68 838-847.
- Bullock, W.O., Fernández, J.M. y Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-378.
- Caetano-Anolles, G. (1993) Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl* 3 85-94.
- Charbonneau, M.E., Janvare, J. y Mourez, M. (2009) Autoprocessing of the *Escherichia coli* AIDA-1 autotransporter; A new mechanism involving acidic residues in the junction region. *J Biol Chem*.
- Cheung, G.Y., Kelly, S.M., Jess, T.J., Prior, S., Price, N.C., Parton, R. y Coote, J.G. (2009) Functional and structural studies on different forms of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 46 36-42.
- Christie, P.J. y Cascales, E. (2005) Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* 22: 51-61.
- Clantin, B., Delattre, A.S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A.C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. y Villeret, V. (2007) Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* 317 957-961.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. y Villeret, V. (2004) The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 6194-6199.
- Collin, S., Guilvout, I., Chami, M. y Pugsley, A.P. (2007) YaeT-independent multimerization and outer membrane association of secretin PulD. *Mol Microbiol* 64 1350-1357.
- Collins, R.F., Beis, K., Dong, C., Botting, C.H., McDonnell, C., Ford, R.C., Clarke, B.R., Whitfield, C. y Naismith, J.H. (2007) The 3D structure of a periplasm-spanning platform required for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2390-2395.
- Collins, R.F. y Derrick, J.P. (2007) Wza: a new structural paradigm for outer membrane secretory proteins? *Trends Microbiol* 15 96-100.

## Bibliografía

- Condemine, G., Berrier, C., Plumbridge, J. y Ghazi, A. (2005) Function and expression of an N-acetylneuraminic acid-inducible outer membrane channel in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 1959-1965.
- Conrath, K.E., Lauwereys, M., Galleni, M., Matagne, A., Frere, J.M., Kinne, J., Wyns, L. y Muyldermans, S. (2001) Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob Agents Chemother* 45 2807-2812.
- Conrath, K.E., Wernery, U., Muyldermans, S. y Nguyen, V.K. (2003) Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev Comp Immunol* 27: 87-103.
- Cornelis, P. (2000) Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr Opin Biotechnol* 11: 450-454.
- Coulthurst, S.J. y Palmer, T. (2008) A new way out: protein localization on the bacterial cell surface via Tat and a novel Type II secretion system. *Mol Microbiol* 69: 1331-1335.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D. y Raina, S. (2001) Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* 276: 20866-20875.
- Datsenko, K.A. y Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 6640-6645.
- Dautin, N. y Bernstein, H.D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* 61 89-112.
- del Fresno, C., Garcia-Rio, F., Gomez-Pina, V., Soares-Schanoski, A., Fernandez-Ruiz, I., Jurado, T., Kajiji, T., Shu, C., Marin, E., Gutierrez del Arroyo, A., Prados, C., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., Biswas, S.K. y Lopez-Collazo, E. (2009) Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol* 182: 6494-6507.
- Doerrler, W.T. y Raetz, C.R. (2005) Loss of outer membrane proteins without inhibition of lipid export in an *Escherichia coli* YaeT mutant. *J Biol Chem* 280: 27679-27687.
- Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan-Lamontagne, A.L., Clarke, B.R., Whitfield, C. y Naismith, J.H. (2006) Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* 444 226-229.
- Doobar, J. y Winter, G. (1994) Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J. Mol. Biol.* 244: 361-369.



- Dougan, G., Haque, A., Pickard, D., Frankel, G., O'Goara, P. y Wain, J. (2001) The *Escherichia coli* gene pool. *Curr Opin Microbiol* 4: 90-94.
- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G., Muyldermans, S., Wyns, L. y Matagne, A. (2002) Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* 11: 500-515.
- Duong, F., Eichler, J., Price, A., Leonard, M.R. y Wickner, W. (1997) Biogenesis of the gram-negative bacterial envelope. *Cell* 91 567-573.
- Earhart, C.F. (2000) Use of an Lpp-OmpA fusion vehicle for bacterial surface display. *Methods Enzymol* 326: 506-516.
- Economou, A., Christie, P.J., Fernandez, R.C., Palmer, T., Plano, G.V. y Pugsley, A.P. (2006) Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* 62 308-319.
- Emsley, P., Charles, I.G., Fairweather, N.F. y Isaacs, N.W. (1996) Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* 381 90-92.
- Eppens, E.F., Nouwen, N. y Tommassen, J. (1997) Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *Embo J* 16 4295-4301.
- Etz, H., Minh, D.B., Schellack, C., Nagy, E. y Meinke, A. (2001) Bacterial phage receptors, versatile tools for display of polypeptides on the cell surface. *J Bacteriol* 183 6924-6935.
- Fernández, L.A. (2004) Prokaryotic expression of antibodies and affibodies. *Curr Opin Biotechnol* 15 364-373.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. y Bateman, A. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 36: D281-288.
- Fischer, W., Buhrdorf, R., Gerland, E. y Haas, R. (2001) Outer membrane targeting of passenger proteins by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 69 6769-6775.
- Galan, J.E. y Wolf-Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444: 567-573.
- Gangwer, K.A., Mushrush, D.J., Stauff, D.L., Spiller, B., McClain, M.S., Cover, T.L. y Lacy, D.B. (2007) Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 16293-16298.

## Bibliografía

- Garmendia, J., Frankel, G. y Crepin, V.F. (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 73: 2573-2585.
- Gatsos, X., Perry, A.J., Anwari, K., Dolezal, P., Wolyneć, P.P., Likic, V.A., Purcell, A.W., Buchanan, S.K. y Lithgow, T. (2008) Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol Rev*
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R. y Lithgow, T. (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* 164 19-24.
- Gentschev, I., Dietrich, G. y Goebel, W. (2002) The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* 10 39-45.
- Gorvel, J.P. y Moreno, E. (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 90: 281-297.
- Griffiths, A.D. y Duncan, A.R. (1998) Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Biotechnol* 9: 102-108.
- Grodberg, J. y Dunn, J.J. (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170 1245-1253.
- Hamburger, Z.A., Brown, M.S., Isberg, R.R. y Bjorkman, P.J. (1999) Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. *Science* 286: 291-295.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N. y Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448.
- Harms, N., Koningstein, G., Dontje, W., Muller, M., Oudega, B., Luirink, J. y de Cock, H. (2001) The early interaction of the outer membrane protein phoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 276: 18804-18811.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. y Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68 692-744.
- Heras, B., Shouldice, S.R., Totsika, M., Scanlon, M.J., Schembri, M.A. y Martin, J.L. (2009) DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172 6557-6567.

- Highlander, S.K., Engler, M.J. y Weinstock, G.M. (1990) Secretion and expression of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *J Bacteriol* 172 2343-2350.
- Hiller, S., Garces, R.G., Malia, T.J., Orekhov, V.Y., Colombini, M. y Wagner, G. (2008) Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science* 321: 1206-1210.
- Ho, M. y Segre, M. (2003) Inhibition of cocaine binding to the human dopamine transporter by a single chain anti-idiotypic antibody: its cloning, expression, and functional properties. *Biochim Biophys Acta* 1638: 257-266.
- Hodak, H. y Jacob-Dubuisson, F. (2007) Current challenges in autotransport and two-partner protein secretion pathways. *Res Microbiol* 158 631-637.
- Holliger, P. y Hudson, P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23 1126-1136.
- Hoogenboom, H.R. (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23 1105-1116.
- Hynonen, U., Westerlund-Wikstrom, B., Palva, A. y Korhonen, T.K. (2002) Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol* 184: 3360-3367.
- Ieva, R., Skillman, K.M. y Bernstein, H.D. (2008) Incorporation of a polypeptide segment into the beta-domain pore during the assembly of a bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* 67 188-201.
- Inaba, K. (2008) Protein disulfide bond generation in *Escherichia coli* DsbB-DsbA. *J Synchrotron Radiat* 15 199-201.
- Ito, K. y Inaba, K. (2008) The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr Opin Struct Biol* 18 450-458.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R. y Coutte, L. (2004) Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* 1694 235-257.
- Jain, S. y Goldberg, M.B. (2007) Requirement for YaeT in the outer membrane assembly of autotransporter proteins. *J Bacteriol*
- Jennings, P.A., Bills, M.M., Irving, D.O. y Mattick, J.S. (1989) Fimbriae of *Bacteroides nodosus*: protein engineering of the structural subunit for the production of an exogenous peptide. *Protein Eng* 2: 365-369.
- Johnson, T.L., Abendroth, J., Hol, W.G. y Sandkvist, M. (2006) Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett* 255 175-186.

## Bibliografía

- Jones, D.T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292: 195-202.
- Jose, J. (2006) Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 607-614.
- Jose, J., Kramer, J., Klauser, T., Pohlner, J. y Meyer, T.F. (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* 178 107-110.
- Jose, J. y Meyer, T.F. (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 600-619.
- Junker, M., Besingi, R.N. y Clark, P.L. (2009) Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Mol Microbiol*.
- Junker, M., Schuster, C.C., McDonnell, A.V., Sorg, K.A., Finn, M.C., Berger, B. y Clark, P.L. (2006) Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 4918-4923.
- Jurado, P., Ritz, D., Beckwith, J., de Lorenzo, V. y Fernandez, L.A. (2002) Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 320 1-10.
- Justice, S.S., Hunstad, D.A., Harper, J.R., Duguay, A.R., Pinkner, J.S., Bann, J., Frieden, C., Silhavy, T.J. y Hultgren, S.J. (2005) Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187 7680-7686.
- Keen, N.T. y Tamaki, S. (1986) Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 168: 595-606.
- Kilian, M., Mestecky, J., Kulhavy, R., Tomana, M. y Butler, W.T. (1980) IgA1 proteases from *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, and *Streptococcus sanguis*: comparative immunochemical studies. *J Immunol* 124: 2596-2600.
- Kim, S., Malinverni, J.C., Sliz, P., Silhavy, T.J., Harrison, S.C. y Kahne, D. (2007) Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* 317 961-964.
- Kingsley, R.A., Abi Ghanem, D., Puebla-Osorio, N., Kestra, A.M., Berghman, L. y Baumber, A.J. (2004) Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA autotransporter protein is inhibited by a

- monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. *J Bacteriol* 186 4931-4939.
- Kjaergaard, K., Hasman, H., Schembri, M.A. y Klemm, P. (2002) Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J Bacteriol* 184: 4197-4204.
- Klemm, P., Hjerrild, L., Gjermansen, M. y Schembri, M.A. (2004) Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 51: 283-296.
- Knowles, T.J., Jeeves, M., Bobat, S., Dancea, F., McClelland, D., Palmer, T., Overduin, M. y Henderson, I.R. (2008) Fold and function of polypeptide transport-associated domains responsible for delivering unfolded proteins to membranes. *Mol Microbiol* 68: 1216-1227.
- Knowles, T.J., Scott-Tucker, A., Overduin, M. y Henderson, I.R. (2009) Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat Rev Microbiol*.
- Koebnik, R., Locher, K.P. y Van Gelder, P. (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37: 239-253.
- Konieczny, M.P.J., Benz, I., Hollinderbaumer, B., Beinke, C., Niederweis, M. y Schmidt, M.A. (2001) Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal beta1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane beta2-domain. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80 19-34.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. y Hughes, C. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405: 914-919.
- Kostakioti, M., Newman, C.L., Thanassi, D.G. y Stathopoulos, C. (2005) Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol* 187 4306-4314.
- Kostakioti, M. y Stathopoulos, C. (2006) Role of the alpha-helical linker of the C-terminal translocator in the biogenesis of the serine protease subfamily of autotransporters. *Infect Immun* 74 4961-4969.
- Krojer, T., Sawa, J., Schafer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M. y Clausen, T. (2008) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* 453: 885-890.
- Kurowski, M.A. y Bujnicki, J.M. (2003) GeneSilico protein structure prediction meta-server. *Nucleic Acids Res* 31: 3305-3307.

- Lang, H. (2000) Outer membrane proteins as surface display systems. *Int J Med Microbiol* 290: 579-585.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. y Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lauwereys, M., Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Kinne, J., Holzer, W., De Genst, E., Wyns, L. y Muyldermans, S. (1998) Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *Embo J* 17 3512-3520.
- Lazar, S.W. y Kolter, R. (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J Bacteriol* 178: 1770-1773.
- Lee, S.Y., Choi, J.H. y Xu, Z. (2003) Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* 21: 45-52.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., Burley, S.K., Almo, S.C. y Mekalanos, J.J. (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4154-4159.
- Lengeler J.W., D.G., Schegel H.G. (1999) *Biology of the prokaryotes*. .
- Leong, J.M., Morrissey, P.E., Marra, A. y Isberg, R.R. (1995) An aspartate residue of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that is critical for integrin binding. *Embo J* 14: 422-431.
- Loveless, B.J. y Saier, M.H., Jr. (1997) A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol* 14 113-123.
- Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E. y de Gier, J.W. (2005) Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 59: 329-355.
- Luo, Y., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Creagh, A.L., Knoechel, D.G., Haynes, C.A., Finlay, B.B. y Strynadka, N.C. (2000) Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* 405 1073-1077.
- Majander, K., Korhonen, T.K. y Westerlund-Wikstrom, B. (2005) Simultaneous display of multiple foreign peptides in the FliD capping and FliC filament proteins of the *Escherichia coli* flagellum. *Appl Environ Microbiol* 71: 4263-4268.
- Malinverni, J.C., Werner, J., Kim, S., Sklar, J.G., Kahne, D., Misra, R. y Silhavy, T.J. (2006) YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 61 151-164.

- Manthei, C.A. (1950) Brucellosis in cattle. Brucellosis. American Association for the Advancement of Science.: 172-187.
- Marshall, B.J. y Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
- McCafferty, J. y Johnson, K.S. (1996) Construction and screening of antibody display libraries. In: Phage display of peptides and proteins. Kay, B.K., Winter, J. y McCafferty, J. (eds). San Diego, California: Academic Press, Inc., pp. 79-111.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S. y Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 1664-1668.
- Mclver, K.S., Kessler, E. y Ohman, D.E. (2004) Identification of residues in the *Pseudomonas aeruginosa* elastase propeptide required for chaperone and secretion activities. *Microbiology* 150 3969-3977.
- Meng, G., St Geme, J.W., 3rd y Waksman, G. (2008) Repetitive architecture of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *J Mol Biol* 384: 824-836.
- Meng, G., Surana, N.K., St Geme, J.W., 3rd y Waksman, G. (2006) Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *Embo J* 25 2297-2304.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M. y Cornelis, G. (1990) Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 58 2840-2849.
- Miller, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Misra, R. (2007) First glimpse of the crystal structure of YaeT's POTRA domains. *ACS Chem Biol* 2 649-651.
- Mistry, D. y Stockley, R.A. (2006) IgA1 protease. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1244-1248.
- Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C.L., 3rd, Ban, N. y Frank, J. (2005) Structure of the *E. coli* protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature* 438 318-324.
- Mogensen, J.E., Tapadar, D., Schmidt, M.A. y Otzen, D.E. (2005) Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *Biochemistry* 44 4533-4545.



## Bibliografía

- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordonez, C.L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A. y Mekalanos, J.J. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312 1526-1530.
- Mueller, C.A., Broz, P. y Cornelis, G.R. (2008) The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* 68 1085-1095.
- Muller, D., Benz, I., Tapadar, D., Buddenborg, C., Greune, L. y Schmidt, M.A. (2005) Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infect Immun* 73 3851-3859.
- Newman, C.L. y Stathopoulos, C. (2004) Autotransporter and two-partner secretion: delivery of large-size virulence factors by gram-negative bacterial pathogens. *Crit Rev Microbiol* 30 275-286.
- Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L. y Muyldermans, S. (2000) Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J* 19: 921-930.
- Nguyen, V.Q., Caprioli, R.M. y Cover, T.L. (2001) Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun* 69 543-546.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 593-656.
- Nishiyama, M., Ishikawa, T., Rechsteiner, H. y Glockshuber, R. (2008) Reconstitution of pilus assembly reveals a bacterial outer membrane catalyst. *Science* 320 376-379.
- Nummelin, H., Merckel, M.C., Leo, J.C., Lankinen, H., Skurnik, M. y Goldman, A. (2004) The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *Embo J* 23: 701-711.
- Okuda, S. y Tokuda, H. (2009) Model of mouth-to-mouth transfer of bacterial lipoproteins through inner membrane LolC, periplasmic LolA, and outer membrane LolB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5877-5882.
- Oliver, D.C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S. y Fernandez, R.C. (2003) A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* 47: 1367-1383.
- Oomen, C.J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J. y Gros, P. (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* 23 1257-1266.



- Otto, B.R., Sijbrandi, R., Luirink, J., Oudega, B., Heddle, J.G., Mizutani, K., Park, S.Y. y Tame, J.R. (2005) Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280 17339-17345.
- Papanikou, E., Karamanou, S. y Economou, A. (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* 5 839-851.
- Pautsch, A. y Schulz, G.E. (2000) High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *J Mol Biol* 298: 273-282.
- Pell, L.G., Kanelis, V., Donaldson, L.W., Howell, P.L. y Davidson, A.R. (2009) The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4160-4165.
- Peterson, J.H., Szabady, R.L. y Bernstein, H.D. (2006) An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor, and the SecYEG complex. *J Biol Chem* 281: 9038-9048.
- Pizarro-Cerda, J. y Cossart, P. (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124 715-727.
- Plano, G.V., Day, J.B. y Ferracci, F. (2001) Type III export: new uses for an old pathway. *Mol Microbiol* 40 284-293.
- Plückthun, A., Krebber, C., Krebber, U., Horn, U., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Nieba, L., Proba, K. y Riesenberger, D. (1996) Producing antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to fermentation. In: *Antibody Engineering: A Practical Approach*. McCafferty, J., Hoogenboom, H.R. y Chiswell, D.J. (eds). Oxford: IRL Press, pp. 203-252.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. y Meyer, T.F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325 458-462.
- Possot, O.M., Vignon, G., Bomchil, N., Ebel, F. y Pugsley, A.P. (2000) Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE. *J Bacteriol* 182 2142-2152.
- Prilipov, A., Phale, P.S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J.P. y Koebnik, R. (1998) Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* 163 65-72.
- Proft, T. y Baker, E.N. (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* 66: 613-635.

- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D. y Mekalanos, J.J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 15508-15513.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F. y Mekalanos, J.J. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 1528-1533.
- Purdy, G.E., Fisher, C.R. y Payne, S.M. (2007) IcsA surface presentation in *Shigella flexneri* requires the periplasmic chaperones DegP, Skp, and SurA. *J Bacteriol* 189: 5566-5573.
- Raetz, C.R. y Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635-700.
- Remaut, H., Tang, C., Henderson, N.S., Pinkner, J.S., Wang, T., Hultgren, S.J., Thanassi, D.G., Waksman, G. y Li, H. (2008) Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell* 133 640-652.
- Renn, J.P. y Clark, P.L. (2008) A conserved stable core structure in the passenger domain beta-helix of autotransporter virulence proteins. *Biopolymers* 89: 420-427.
- Rhodus, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J. y Gross, C.A. (2006) Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* 4: e2.
- Rizzitello, A.E., Harper, J.R. y Silhavy, T.J. (2001) Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 6794-6800.
- Robert, V., Volokhina, E.B., Senf, F., Bos, M.P., Van Gelder, P. y Tommassen, J. (2006) Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* 4 e377.
- Rouvière, P.E. y Gross, C.A. (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* 10: 3170-3182.
- Roux, A., Beloin, C. y Ghigo, J.M. (2005) Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: application to identification of new *Escherichia coli* adhesins. *J Bacteriol* 187 1001-1013.
- Ruiz, N., Kahne, D. y Silhavy, T.J. (2006a) Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol* 4: 57-66.

- Ruiz, N., Wu, T., Kahne, D. y Silhavy, T.J. (2006b) Probing the barrier function of the outer membrane with chemical conditionality. *ACS Chem Biol* 1 385-395.
- Ruiz-Perez, F., Henderson, I.R., Leyton, D.L., Rossiter, A., Zhang, Y. y Nataro, J.P. (2009) Roles Of Periplasmic Chaperone Proteins In The Biogenesis Of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. *J Bacteriol*.
- Saerens, D., Ghassabeh, G.H. y Muyldermans, S. (2008) Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 8: 600-608.
- Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P.A. y Stahl, S. (2002) Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol* 96: 129-154.
- Sandkvist, M. (2001) Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 40 271-283.
- Sardesai, A.A., Genevaux, P., Schwager, F., Ang, D. y Georgopoulos, C. (2003) The OmpL porin does not modulate redox potential in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Embo J* 22: 1461-1466.
- Sauer, F.G., Remaut, H., Hultgren, S.J. y Waksman, G. (2004) Fiber assembly by the chaperone-usheer pathway. *Biochim Biophys Acta* 1694 259-267.
- Saul, F.A., Arie, J.P., Vulliez-le Normand, B., Kahn, R., Betton, J.M. y Bentley, G.A. (2004) Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J Mol Biol* 335 595-608.
- Schäfer, U., Beck, K. y Muller, M. (1999) Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J Biol Chem* 274: 24567-24574.
- Schägger, H., Cramer, W.A. y von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217: 220-230.
- Schlapschy, M., Dommel, M.K., Hadian, K., Fogarasi, M., Korndorfer, I.P. y Skerra, A. (2004) The periplasmic *E. coli* chaperone Skp is a trimer in solution: biophysical and preliminary crystallographic characterization. *Biol Chem* 385 137-143.
- Schnaitman, C.A. (1971) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolate cell walls of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 108 553-563.
- Shrivastava, R. y Miller, J.F. (2009) Virulence factor secretion and translocation by *Bordetella* species. *Curr Opin Microbiol* 12: 88-93.

- Skillman, K.M., Barnard, T.J., Peterson, J.H., Ghirlando, R. y Bernstein, H.D. (2005) Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* 58 945-958.
- Sklar, J.G., Wu, T., Gronenberg, L.S., Malinverni, J.C., Kahne, D. y Silhavy, T.J. (2007a) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 6400-6405.
- Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D. y Silhavy, T.J. (2007b) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 21 2473-2484.
- Sohanpal, B.K., El-Labany, S., Lahooti, M., Plumbridge, J.A. y Blomfield, I.C. (2004) Integrated regulatory responses of fimB to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16322-16327.
- Sparks, A.B., Quilliam, L.A., Thorn, J.M., Der, C.J. y Kay, B.K. (1994) Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries. *J. Biol. Chem.* 269: 23853-23856.
- Sperandeo, P., Deho, G. y Polissi, A. (2009) The Lipopolysaccharide transport system of Gram-negative Bacteria. *Biochim Biophys Acta*.
- Spiess, C., Beil, A., Ehrmann, M., Delepelaire, P. y Wandersman, C. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97: 339-347.
- Spinelli, S., Tegoni, M., Frenken, L., van Vliet, C. y Cambillau, C. (2001) Lateral recognition of a dye hapten by a llama VHH domain. *J Mol Biol* 311: 123-129.
- St Geme, J.W., 3rd y Cutter, D. (2000) The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol* 182: 6005-6013.
- Stegmeier, J.F. y Andersen, C. (2006) Characterization of pores formed by YaeT (Omp85) from *Escherichia coli*. *J Biochem* 140: 275-283.
- Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, S.L., Robinson, C.V., Ilag, L.L., von Heijne, G. y Daley, D.O. (2005) Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. *J Biol Chem* 280: 34409-34419.
- Subbarao, G.V. y van den Berg, B. (2006) Crystal structure of the monomeric porin OmpG. *J Mol Biol* 360 750-759.
- Surana, N.K., Grass, S., Hardy, G.G., Li, H., Thanassi, D.G. y Geme, J.W., 3rd (2004) Evidence for conservation of architecture and physical properties of

- Omp85-like proteins throughout evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 14497-14502.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. y Koronakis, V. (1998) Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from E.coli: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *Embo J* 17: 6487-6496.
- Touze, T., Hayward, R.D., Eswaran, J., Leong, J.M. y Koronakis, V. (2004) Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. *Mol Microbiol* 51 73-87.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W.I. y Rapoport, T.A. (2001) Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* 104 937-948.
- Tullman-Ercek, D., DeLisa, M.P., Kawarasaki, Y., Iranpour, P., Ribnicky, B., Palmer, T. y Georgiou, G. (2007) Export pathway selectivity of Escherichia coli twin arginine translocation signal peptides. *J Biol Chem* 282 8309-8316.
- Turner, D.P., Wooldridge, K.G. y Ala'Aldeen, D.A. (2002) Autotransported serine protease A of Neisseria meningitidis: an immunogenic, surface-exposed outer membrane, and secreted protein. *Infect Immun* 70 4447-4461.
- Udekwi, K.I. y Wagner, E.G. (2007) Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA MicA. *Nucleic Acids Res* 35: 1279-1288.
- Ureta, A.R., Endres, R.G., Wingreen, N.S. y Silhavy, T.J. (2007) Kinetic analysis of the assembly of the outer membrane protein LamB in Escherichia coli mutants each lacking a secretion or targeting factor in a different cellular compartment. *J Bacteriol* 189 446-454.
- Valls, M., Atrian, S., de Lorenzo, V. y Fernandez, L.A. (2000) Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of Ralstonia eutropha CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol* 18 661-665.
- Valls, M., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S. y De Lorenzo, V. (1998) Bioaccumulation of heavy metals with protein fusions of metallothionein to bacterial OMPs. *Biochimie* 80: 855-861.
- van der Zee, A., Noordegraaf, C.V., van den Bosch, H., Gielen, J., Bergmans, H., Hoekstra, W. y van Die, I. (1995) P-fimbriae of Escherichia coli as carriers for gonadotropin releasing hormone: development of a recombinant contraceptive vaccine. *Vaccine* 13: 753-758.
- van Die, I., van Oosterhout, J., van Megen, I., Bergmans, H., Hoekstra, W., Enger-Valk, B., Barteling, S. y Mooi, F. (1990) Expression of foreign epitopes in P-fimbriae of Escherichia coli. *Mol Gen Genet* 222: 297-303.

## Bibliografía

- van Ulsen, P., van Alphen, L., ten Hove, J., Fransen, F., van der Ley, P. y Tommassen, J. (2003) A Neisserial autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. *Mol Microbiol* 50 1017-1030.
- Veiga, E., de Lorenzo, V. y Fernandez, L.A. (1999) Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol Microbiol* 33 1232-1243.
- Veiga, E., de Lorenzo, V. y Fernandez, L.A. (2003a) Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: surface properties of *Escherichia coli* cells displaying Jun/Fos dimerization domains. *J Bacteriol* 185 5585-5590.
- Veiga, E., De Lorenzo, V. y Fernandez, L.A. (2003b) Neutralization of enteric coronaviruses with *Escherichia coli* cells expressing single-chain Fv-autotransporter fusions. *J Virol* 77 13396-13398.
- Veiga, E., de Lorenzo, V. y Fernandez, L.A. (2004) Structural tolerance of bacterial autotransporters for folded passenger protein domains. *Mol Microbiol* 52 1069-1080.
- Veiga, E., Sugawara, E., Nikaido, H., de Lorenzo, V. y Fernandez, L.A. (2002) Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *Embo J* 21 2122-2131.
- Vogel, J. y Papenfort, K. (2006) Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol* 9: 605-611.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M. y Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299 262-265.
- Voulhoux, R. y Tommassen, J. (2004) Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res Microbiol* 155 129-135.
- Wagner, J.K., Heindl, J.E., Gray, A.N., Jain, S. y Goldberg, M.B. (2009) Contribution of the periplasmic chaperone Skp to efficient presentation of the autotransporter IcsA on the surface of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* 191: 815-821.
- Walther, D.M., Rapaport, D. y Tommassen, J. (2009) Biogenesis of beta-barrel membrane proteins in bacteria and eukaryotes: evolutionary conservation and divergence. *Cell Mol Life Sci*.
- Walton, T.A. y Sousa, M.C. (2004) Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol Cell* 15 367-374.
- Wells, T.J., Sherlock, O., Rivas, L., Mahajan, A., Beatson, S.A., Torpdahl, M., Webb, R.I., Allsopp, L.P., Gobijs, K.S., Gally, D.L. y Schembri, M.A. (2008)

- EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol* 10 589-604.
- Wen, S. y Moss, S.F. (2008) *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*
- Wentzel, A., Christmann, A., Adams, T. y Kolmar, H. (2001) Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *J Bacteriol* 183 7273-7284.
- Werner, J. y Misra, R. (2005) YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and lipid-independent outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 57: 1450-1459.
- Wernerus, H. y Stahl, S. (2004) Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem* 40: 209-228.
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D.V., Goldbaum, F.A., Haag, F. y Koch-Nolte, F. (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* 198: 157-174.
- Wright, R.M., Gram, H., Vattay, A., Byrne, S., Lake, P. y Dottavio, D. (1995) Binding epitope of somatostatin defined by phage-displayed peptide libraries. *Bio/Technology* 13: 165-169.
- Wu, P.H., Giridhar, R. y Wu, W.T. (2006) Surface display of transglucosidase on *Escherichia coli* by using the ice nucleation protein of *Xanthomonas campestris* and its application in glucosylation of hydroquinone. *Biotechnol Bioeng* 95: 1138-1147.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T.J. y Kahne, D. (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* 121 235-245.
- Yang, Z., Liu, Q., Wang, Q. y Zhang, Y. (2008) Novel bacterial surface display systems based on outer membrane anchoring elements from the marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol* 74: 4359-4365.
- Yen, Y.T., Kostakioti, M., Henderson, I.R. y Stathopoulos, C. (2008) Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends Microbiol* 16 370-379.
- Zhang, F., Yin, Y., Arrowsmith, C.H. y Ling, V. (1995) Secretion and circular dichroism analysis of the C-terminal signal peptides of HlyA and LktA. *Biochemistry* 34: 4193-4201.



## Bibliografía

Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K.A., Schneider, T.D. y Storz, G. (2001) Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 4571-4579.